



This is a digital copy of a book that was preserved for generations on library shelves before it was carefully scanned by Google as part of a project to make the world's books discoverable online.

It has survived long enough for the copyright to expire and the book to enter the public domain. A public domain book is one that was never subject to copyright or whose legal copyright term has expired. Whether a book is in the public domain may vary country to country. Public domain books are our gateways to the past, representing a wealth of history, culture and knowledge that's often difficult to discover.

Marks, notations and other marginalia present in the original volume will appear in this file - a reminder of this book's long journey from the publisher to a library and finally to you.

Usage guidelines

Google is proud to partner with libraries to digitize public domain materials and make them widely accessible. Public domain books belong to the public and we are merely their custodians. Nevertheless, this work is expensive, so in order to keep providing this resource, we have taken steps to prevent abuse by commercial parties, including placing technical restrictions on automated querying.

We also ask that you:

- + *Make non-commercial use of the files* We designed Google Book Search for use by individuals, and we request that you use these files for personal, non-commercial purposes.
- + *Refrain from automated querying* Do not send automated queries of any sort to Google's system: If you are conducting research on machine translation, optical character recognition or other areas where access to a large amount of text is helpful, please contact us. We encourage the use of public domain materials for these purposes and may be able to help.
- + *Maintain attribution* The Google "watermark" you see on each file is essential for informing people about this project and helping them find additional materials through Google Book Search. Please do not remove it.
- + *Keep it legal* Whatever your use, remember that you are responsible for ensuring that what you are doing is legal. Do not assume that just because we believe a book is in the public domain for users in the United States, that the work is also in the public domain for users in other countries. Whether a book is still in copyright varies from country to country, and we can't offer guidance on whether any specific use of any specific book is allowed. Please do not assume that a book's appearance in Google Book Search means it can be used in any manner anywhere in the world. Copyright infringement liability can be quite severe.

About Google Book Search

Google's mission is to organize the world's information and to make it universally accessible and useful. Google Book Search helps readers discover the world's books while helping authors and publishers reach new audiences. You can search through the full text of this book on the web at <http://books.google.com/>

UC-NRLF



B 3 481 490



THE LIBRARY
OF
THE UNIVERSITY
OF CALIFORNIA

EMIL FISCHER COLLECTION

PRESENTED BY HIS SON

Prof.

R

HOPPE-SEYLER'S ZEITSCHRIFT

für

PHYSIOLOGISCHE CHEMIE

unter Mitwirkung von

G. v. BUNGE-Basel, P. EHRLICH-Frankfurt a. M., EMIL FISCHER-Berlin, O. HAMMARSTEN-Upsala, G. HOPPE-SEYLER-Kiel, C. G. HÜFNER-Tübingen, M. JAFFÉ-Königsberg, FR. KUTSCHER-Marburg, E. LUDWIG-Wien, CARL TH. MÖRNER-Upsala, K. A. H. MÖRNER-Stockholm, W. OSTWALD-Leipzig, I. P. PAWLOW-St. Petersburg, C. A. PEKELHARING-Utrecht, E. SALKOWSKI-Berlin, E. SCHULZE-Zürich, H. THIERFELDER-Berlin

herausgegeben von

A. KOSSEL,

Professor der Physiologie in Heidelberg.

FÜNFUNDVIERZIGSTER BAND.

Mit 26 Kurvenzeichnungen auf 13 Tafeln und einer lithographischen Tafel.

STRASSBURG

VERLAG VON KARL J. TRÜBNER

1905.

Chemistry Lib.

M. DuMont Schauberg, Straßburg.

QP 501
H7
v. 45

~~CHEMISTRY~~
~~LIBRARY~~
BIOCHEM.
LIBRARY

Inhalt des fünfundvierzigsten Bandes.

HEFT I und II.	Seite
(Ausgegeben am 5. Juli 1905.)	
Krüger, Martin, und Julius Schmid. Zur Bestimmung der Harnsäure und Purinbasen im menschlichen Harn	1
Krüger, Martin, und Alfred Schittenhelm. Die Menge und Herkunft der Purinkörper in den menschlichen Faeces. II. Mitteilung	14
Ellinger, Alexander, und Max Cohn. Beiträge zur Kenntnis der Pankreassekretion beim Menschen	28
Schulze, E., und E. Winterstein. Über die aus den Keimpflanzen von <i>Vicia sativa</i> und <i>Lupinus albus</i> darstellbaren Monoaminosäuren	38
Winterstein, E., und E. Pantanelli. Über die bei der Hydrolyse der Eiweißsubstanz der Lupinensamen entstehenden Monoaminosäuren	61
Winterstein, E. Zur Kenntnis der aus Ricinussamen darstellbaren Eiweißsubstanzen	69
— — Über ein Verfahren zur Isolierung des Lysins	77
Schulze, E., und E. Winterstein. Über das spezifische Drehungsvermögen einiger aus Pflanzen dargestellten Tyrosinpräparate	79
Jones, Walter. Über das Vorkommen der Guanase in der Rindermilz und ihr Fehlen in der Milz des Schweines	84
Neuberg, Carl. Synthese von Oxy- und Diaminosäuren. II. Mitteilung: Über Diaminokorksäure und Diaminosebacinsäure	92
— — Zur Kenntnis der Diamine. II. Mitteilung: Eine neue Synthese der Diamine	110
Schittenhelm, Alfred. Über die Harnsäurebildung und die Harnsäurezersetzung in den Auszügen der Rinderorgane. Ein weiterer Beitrag zur Kenntnis der Fermente des Nucleinstoffwechsels	121
— — Zu den Versuchen von Jones, Partridge und Winternitz über das Fehlen des Guanin zu Xanthin umwandelnden Fermentes in Milz und Leber des Rindes	152
— — Über das uricolytische Ferment	161

M643310

	Seite
Pregl, Fritz. Über die Ursache der Schwefelsäure-Fluoreszenzreaktion der Gallensäuren	166
Goldmann, H., J. Hetper und L. Marchlewski. Studien über den Blutfarbstoff. V. vorläufige Mitteilung	176
Neuberg, Carl. Zur Bestimmung der Glukuronsäure	183

HEFT III und IV.

(Ausgegeben am 30. Juli 1905.)

Tobler, Ludwig. Über die Eiweißverdauung im Magen	185
Neumann, Walter. Über Peptone. Mit 26 Kurvenzeichnungen auf 13 Tafeln	216
Siegfried, M. Zur Kenntnis der Peptone	252
Bial, Manfred. Über den Befund von gepaarter Glukuronsäure in der Galle	258
Müller, Karl. Die chemische Zusammensetzung der Zellmembranen bei verschiedenen Kryptogamen	265
— — Beitrag zur Kenntnis der ätherischen Öle bei Lebermoosen	299
Kotake, Y. Über das Schicksal des Vanillins im Tierkörper . .	320
Gulewitsch, Wl. und R. Krimberg. Zur Kenntnis der Extraktivstoffe der Muskeln. II. Mitteilung: Über das Carnitin . .	326
Issajew, W. Über die Malzoxydase	331
Burian, Richard. Ein letztes Wort zu den Permanganatversuchen von Kutscher und Seemann	351
Heubner, Wolfgang. Zur Fibrinoglobulinfrage. Bemerkungen zu der gleichnamigen Arbeit von W. Huiskamp	355

HEFT V und VI.

(Ausgegeben am 29. August 1906.)

Simon, Charles E. Über Fütterungsversuche mit Monoamino-säuren bei Cystinurie	357
Ofner, Rudolf. Über den Nachweis von Fruchtzucker in menschlichen Körpersäften	359
Levene, P. A. Darstellung und Analyse einiger Nucleinsäuren. VIII. Mitteilung. Über die Milznucleinsäure	370
London, E. S. Zum Verdauungsschemismus im tierischen Organismus unter physiologischen und pathologischen Verhältnissen. I. Mitteilung	381
Mandel, John A., und P. A. Levene. Über die Verbreitung von Glukothionsäure in tierischen Organen	386
Bödtker, Eyvind. Beitrag zur Kenntnis der Cystinurie	393
Fischer, Emil, und Umetarō Suzuki. Zur Kenntnis des Cystins .	405
Wells, H. Gideon. Versuche über den Transport von jodiertem Fett bei Phosphorvergiftung	412
Euler, Hans. Katalyse durch Fermente	420
Gullbring, Alf. Über die Taurocholeinsäure der Rindergalle . .	448

	Seite
Oerum, H. P. T. Quantitative Indicanbestimmung im Harne mit dem Meislingschen Kolorimeter	459
Marchlewski, L. Über den Ursprung des Cholehämamins (Bili-purpurins)	466
Abderhalden, Emil, und Alfred Schittenhelm. Ausscheidung von Tyrosin und Leucin in einem Falle von Cystinurie . .	468
Abderhalden, Emil, und Yutaka Teruchi. Die Zusammen-setzung von aus Kiefernssamen dargestelltem Eiweiß . . .	473
Abderhalden, Emil, und J. B. Herrick. Beitrag zur Kenntnis der Zusammensetzung des Conglutins aus Samen von Lupinus	479
Porcher, Ch., und Ch. Hervieux. Untersuchungen über das Skatol. Mit einer Tafel	486
Levene, P. A. Bemerkung zu der Mitteilung der Herren Kutscher und Lohmann: «Die Endprodukte der Pankreasselbststver-dauung»	498
Neuberg, Carl. Notiz über den Nachweis von Fructose neben Glucosamin	500

Alphabetisches Verzeichnis der Autorennamen.

Abderhalden, E., u. J. B. Herrick, 479	Krimberg, s. Gulewitsch.
— — und A. Schittenhelm, 468.	Krüger, M., und Schittenhelm, 14.
— — und Yutaka Teruchi, 473.	— — und J. Schmid, 1.
Bial, M., 258.	Levene, P. A., 370.
Bödtker, E., 393.	— — 496.
Burian, R., 351.	Levene, s. Mandel.
Cohn, M., s. Ellinger.	London, E. S., 381.
Ellinger, A., und M. Cohn, 28.	Mandel, J. A., und Levene, 386.
Euler, H., 420.	Marchlewski, L., 466.
Fischer, E., und U. Suzuki, 405.	Marchlewski, s. Goldmann.
Goldmann, Hetper und Marchlewski, 176.	Müller, K., 265.
Gulewitsch, W., und Krimberg, 326.	— — 299.
Gullbring, A., 448.	Neuberg, C., 92.
Herrick, s. Abderhalden.	— — 110.
Hervieux, s. Porcher.	— — 183.
Hetper, s. Goldmann.	— — 500.
Heubner, W., 355.	Neumann, W., 216.
Jones, W., 84.	Oerum, H. P. T., 459.
Issajew, W., 331.	Ofner, R., 359.
Kotake, Y., 320.	Porcher, Ch., und Hervieux, 486.
	Pregl, F., 166.

Schittenhelm, A., 121.
— — 152.
— — 161.
Schittenhelm, s. Krüger.
Schittenhelm, s. Abderhalden.
Schmid, J., s. Krüger.
Schulze, E., und Winterstein, 38.
— — 79.
Siegfried, M., 252.

Simon, Ch. E., 357.
Suzuki, s. E. Fischer.
Teruuchi, s. Abderhalden.
Tobler, L., 185.
Wells, H. G., 412.
Winterstein, E., 69.
— — 77.
— — und Pantanelli, 61.
Winterstein, s. Schulze.



Zur Bestimmung der Harnsäure und Purinbasen im menschlichen Harn.¹⁾

Von

Martin Krüger und Julius Schmid.

(Der Redaktion zugegangen am 23. April 1905.)

Von den vier zur Ausfällung von Purinkörpern gebräuchlichen Reagentien, Phosphorwolframsäure, Kupferacetat, ammoniakalischer Silberlösung und Kupfersulfat plus Bisulfit, kommen für eine bequeme und exakte quantitative Bestimmung der genannten Verbindungen nur die beiden letzten in Betracht. Die bisher üblichsten Methoden, welche die Purinbasen neben der Harnsäure bestimmen wollen, beruhen auf der Anwendung der Silberlösung.

Als Kupferoxydulverbindungen werden Harnsäure und Basen nach dem Verfahren von Krüger und Wulff²⁾ gefällt, der Niederschlag, welcher durch Kupfersulfat und Natriumbisulfit im siedenden Harn erzeugt wurde, sollte nur den Stickstoff der Purinkörper enthalten.

Diese in der ersten Zeit nach ihrer Veröffentlichung sehr häufig und von den verschiedensten Seiten angewendete Methode wurde später als unrichtig erkannt.³⁾ Nach Salkowski übertrifft zwar in geringem Grade das Kupferverfahren an Schärfe das Silberreagens, aber das Plus an Purinbasenstickstoff, welches

¹⁾ Die beiden folgenden Arbeiten sind schon vor mehreren Jahren im Laboratorium der medizinischen Klinik zu Breslau (Geh. Rat Kast †) ausgeführt worden. Ihre Veröffentlichung erlitt einen unerwünschten Aufschub durch die langwierige schwere Erkrankung M. Krügers; leider wurde inzwischen der allseitig beliebte Kollege und bahnbrechende Forscher auf dem Gebiet der Purinkörper der Wissenschaft zu frühzeitig durch den Tod entrissen.
Schittenhelm-Schmid.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XX, S. 176 (1895).

³⁾ Sitzungsbericht der Frankfurter Naturforschervers. Berl. klin. Wochenschr., 1896, S. 970. Salkowski, Deutsche med. Wochenschr., 1897, S. 213 und Pflügers Arch., Bd. LXIX, S. 287 (1898).

sich nach der Krüger-Wulffschen Methode verglichen mit dem aus der Silberfällung ergibt, ist bedeutend größer, als es dem geringen Unterschiede im Fällungsvermögen der beiden Reagentien entspricht. Es müssen daher aus dem Harn noch andere N-haltige Körper mitgefällt werden. Zu diesen gehören nach Huppert¹⁾ Rhodan, Eiweiß und Albumosen,²⁾ und zwar nicht nur die koagulablen, die Hellersche Probe gebenden Eiweißkörper, sondern auch jene in jedem normalen Harn vorhandenen, von Mörner³⁾ entdeckten Eiweißkörper. Huppert hat übrigens die genannten Verbindungen nicht im Kupferoxydulniederschlag des Harns nachgewiesen, sondern er führt nur an, daß diese Körper, «wenn sie dem Harn zugesetzt werden, nach dem Verfahren von Krüger-Wulff quantitativ wiedergefunden werden.»

Eine bemerkenswerte Angabe darüber, daß die Fällung der Purinkörper durch das Kupferreagens bei Anwesenheit eines bestimmten Körpers beeinträchtigt werden kann, hat Zülzer⁴⁾ gemacht.

Wenn man nach ihm dem Harne Chlornatrium zugibt, so sinkt der nach der Krüger-Wulffschen Methode ermittelte Stickstoff mit Zunahme des Kochsalzgehaltes. Als Erklärung fügt er die bekannte Tatsache an, daß «auch ein geringer Zusatz von Kochsalzlösung zu einer einfachen Kupfersulfatnatriumbisulfitmischung den sonst in der Hitze entstehenden Kupferoxydulniederschlag zu hindern imstande ist.»

Nach Krüger sind die Verbindungen, welche aus Purinkörpern durch Fällung mit Kupfersulfat und Bisulfit entstehen, nicht als reine Kupferoxydulverbindungen, sondern, da sie gleichzeitig noch Schwefelsäure enthalten, welche selbst durch andauerndes Waschen nicht entfernt werden kann, als basisch schwefelsaure Purinkupferoxydulverbindungen anzusehen. Bei Gegenwart von Kochsalz scheidet sich, wie Zülzer ganz richtig erwähnt, kein Kupferoxydul aus, es entsteht vielmehr das in

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 556 (1896/97).

²⁾ S. auch Strauss, Frankf. Naturforschervers., Berl. klin. Wochenschrift, 1896, S. 970.

³⁾ Skandinav. Arch. f. Phys., Bd. VI, S. 332 (1895).

⁴⁾ Berlin. klin. Wochenschr., 1896, S. 74.

der Wärme lösliche Kupferchlorür. Dieses wird mit Purinkörpern analog der Schwefelsäure basisch salzsaure Verbindungen bilden, welche jedenfalls leichter löslich sind, als die basisch schwefelsauren Salze und daher zunächst teilweise gelöst bleiben; hierfür spricht die Beobachtung von Zülzer. Die Löslichkeit aller basischen Salze nimmt nun aber ab mit der Zunahme ihrer Basicität und Abnahme ihrer Acidität. Dieser Übergang in schwerer lösliche, resp. unlösliche Verbindungen wird einmal bewirkt durch längeres Kochen mit Wasser oder aber schneller und glatter durch Umsetzen mit Salzen schwächer, etwa organischer Säuren, welche keine basischen Salze mehr bilden oder deren basische Salze durch Wasser sofort in Base und freie Säure gespalten werden.

Zur Entscheidung der Frage, welches von den beiden Fällungsmitteln der Purinkörper, ammoniakalische Silberlösung oder Kupfersulfat plus Bisulfit, besser zur Abscheidung und quantitativen Bestimmung derselben geeignet ist oder ob beide in gleich guter Weise diesen Zweck erfüllen, kann nach unserer Ansicht eine eingehende Prüfung der Harnsäure und sämtlicher im Harn gefundenen Purinbasen auf ihr Verhalten zu den beiden Reagentien nicht umgangen werden.

Daß Harnsäure als Magnesiumsilberdoppelsalz völlig ausfällt, ist erwiesen. Bis zu welchem Grade von Genauigkeit aber die Silberfällung bei den Purinbasen führt, ist bisher nicht systematisch geprüft worden. Bekannt ist, daß die Silberverbindungen aller Basen mehr oder weniger, wenn auch stets nur in geringem Maße, in Ammoniak löslich sind (s. darüber an späterer Stelle).

1. Prüfung des Kupferreagens als quantitatives Fällungsmittel.

Wir haben zunächst das Kupferreagens einer eingehenden Prüfung unterzogen, und zwar bei Harnsäure und allen Basen, welche nach den bisherigen Beobachtungen im Harne vorkommen sollen. Von den Basen standen uns mit Ausnahme des Carnins alle in chemisch reinem Zustande zur Verfügung: Xanthin, 1-Methylxanthin, 7-Methylxanthin (Heteroxanthin), 1,7-Dimethylxanthin (Paraxanthin), Guanin, 7-Methylguanin (Epi-

guanin), Adenin und Hypoxanthin. Auch Theophyllin (1,3-Dimethylxanthin) wurde noch hinzugenommen, da es bei Hunden als Stoffwechselprodukt nach Caffein auftritt.

Die Untersuchung geschah in folgender Weise: Es wurden in der Regel 0,3 g der freien Basen — vom Guanin kam das Sulfat und vom Hypoxanthin das Nitrat zur Anwendung — in 300 ccm Wasser, ev. unter Zusatz von etwas Natronlauge gelöst; dasselbe geschah mit der Harnsäure.

In je 50 ccm der einzelnen Lösungen wurde dann zunächst der Stickstoff nach Kjeldahl ermittelt. In weiteren 50 ccm wurden nach dem Verdünnen auf 100 ccm die Basen, resp. die Harnsäure durch Kupfersulfat und Natriumbisulfat ausgefällt. Zu dem Zwecke wurden die Lösungen zunächst zum Sieden erhitzt und dann 10 ccm Natriumbisulfat und 10 ccm einer 10%igen Kupfersulfatlösung hinzugegeben. Nach dem Zusatz des Fällungsmittels wurde die Flüssigkeit noch mindestens 3 Minuten im Sieden erhalten. Der Niederschlag muß, wenn die Fällung vollständig sein soll, stets braun bis dunkelbraun gefärbt sein. Er wird dann sofort von der heißen Flüssigkeit durch ein Faltenfilter aus dem schwedischen Papier von J. Munktell abfiltriert, dreimal mit heißem Wasser ausgewaschen und samt dem Filter nach Kjeldahl zerstört. Zu einer dritten Portion von 50 ccm (verdünnt auf 100 ccm) wurden, um den Einfluß des Natriumchlorids auf die Fällung kennen zu lernen, 2 g desselben hinzugegeben, zu einer vierten Portion von 50 ccm (gleichfalls verdünnt auf 100 ccm) außer 2 g Natriumchlorid noch 6 g Natriumacetat. Dann wurden in beiden Versuchen in der oben angegebenen Weise wiederum die Harnsäure bzw. die Basen durch das Kupferreagens gefällt.

Die Resultate sind in der folgenden Tabelle mitgeteilt.

Von Harnsäure wurden ferner 0,0643 g bei Gegenwart von 2 g Kochsalz mit Kupfersulfat und Bisulfat gefällt. Verbraucht wurden für den N-Gehalt des Niederschlags 15,4 ccm $\frac{1}{10}$ N-Säure, entsprechend 0,0647 g Harnsäure. Mit Epiguanin wurde nur ein einziger Versuch angestellt; und zwar wurden 0,0334 g gleichfalls aus kochsalzhaltiger Lösung gefällt. Da 10,1 ccm $\frac{1}{10}$ N-Säure verbraucht wurden, sind 0,0333 g Epiguanin wiedergefunden.

Tabelle I.

N-Gehalt in Kubikzentimeter $\frac{1}{10}$ N-Säure.

Purinkörper	Nach Kjeldahl ccm	$\text{CuSO}_4 +$ NaHSO_3 ccm	2 g NaCl ccm	2 g NaCl + 6 g Acetat ccm
Harnsäure	12,04	12,05	—	12,11, 12,00, 12,05
Xanthin	13,23	13,34	13,20	13,14
1-Methylxanthin . .	6,58	6,55	6,54	6,64
7-Methylxanthin . .	12,44	12,48	12,30	12,45
Paraxanthin	11,88	11,88	11,75	11,96
Theophyllin	10,42	10,42	10,33	10,45
Guaninsulfat	12,09	12,02	12,16	12,13
Hypoxanthinnitrat .	—	9,51	9,62	9,70
Adenin	18,14	17,94	18,00	18,20, 18,10

Die obigen Zahlen beweisen mit Sicherheit, daß die Fällung der Harnsäure und aller Purinbasen durch Kupfersulfat und Bisulfit stets eine vollständige ist, gleichgültig ob sie in Lösungen, die nur Purinkörper allein, oder auch bei Gegenwart von Kochsalz (in der zugesetzten Menge von 2%) und Kochsalz plus Natriumacetat ausgeführt wird. Wenn demnach zwar das Kochsalz die Vollständigkeit der Fällung nicht hindert, so ist doch ein Einfluß desselben unverkennbar vorhanden, insofern es die Bildung des Kupferoxydulniederschlages verzögert. Eine solche Verzögerung trat am auffallendsten beim Paraxanthin ein, bei welchem die Fällung zunächst überhaupt ausblieb, bezw. nur eine geringe Trübung entstand. Aufkochen vermehrt den Niederschlag zusehends und nach 3 Minuten langem Sieden ist derselbe braun; das Filtrat scheidet beim Abkühlen keine flockige weiße Kupferoxydulverbindung mehr aus. Beim Paraxanthin übrigens erweist sich die Kupferoxydulverbindung unter dem Mikroskope als aus sehr feinen, langen Nadeln bestehend. Die durch Kochsalz verursachte Verzögerung der Purinkörperfällung wird, wie erwartet wurde, durch Natriumacetat sofort aufgehoben.

Wie verhalten sich nun die Purinbasen gegenüber der

ammoniakalischen Silberlösung und in wie hohem Grade wird die Silberfällung durch den Gehalt der Lösungen an Ammoniak beeinflußt? Da die lösende Wirkung des Ammoniaks nach den bisherigen Angaben zwar bemerkbar, doch stets nur gering sein soll, so empfahl es sich, für die Versuche solche Basen zu wählen, deren Silberverbindungen voraussichtlich am leichtesten löslich sein müßten; es sind das die beiden Dimethylxanthine, Theophyllin und Paraxanthin — Theobromin, als drittes Dimethylxanthin, wird bekanntlich weder durch ammoniakalische Silberlösung noch durch Kupfersulfat und Bisulfit gefällt — welche in ihrem Molekül nur noch eine substituierbare Imidgruppe enthalten und daher auch nur mit je einem Atom Silber Verbindungen liefern können.

Wir haben unsere Versuche zunächst mit dem Paraxanthin angestellt. Nachdem in einem gemessenen Teil einer Paraxanthinlösung der Stickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt war, wurden gleiche Mengen derselben Lösung mit je 2 g Kochsalz, 10 ccm Silberlösung und darauf mit wechselnden Mengen von Ammoniak versetzt. Die Silberfällung wurde nach 3 stündigem Stehen abfiltriert, mit destilliertem Wasser gewaschen und durch Aufkochen mit Magnesia usta von den letzten Resten des Ammoniak befreit. Schließlich wurde wieder der Stickstoff nach Kjeldahl ermittelt. Vorhergehende Kontrollversuche mit mehreren Basen, Paraxanthin, Adenin, Hypoxanthin, Guanin und Xanthin, hatten uns überzeugt, daß deren Silberverbindungen mit Magnesia usta in wässriger Lösung absolut beständig sind und keine Spur von Ammoniak liefern.

Paraxanthinlösung:

1. 50 ccm nach Kjeldahl : 8,3 ccm $\frac{1}{10}$ N-Säure
2. 50 ccm + 2 g NaCl + 10 ccm AgNO_3 -Lösung +
20 ccm 10%iges NH_3 : 5,8 ccm
3. 50 ccm + 2 g NaCl + 10 ccm AgNO_3 -Lösung +
40 ccm 10%iges NH_3 : 3,83 ccm
4. 50 ccm + 2 g NaCl + 10 ccm AgNO_3 -Lösung +
60 ccm 10%iges NH_3 : 0,51 ccm

Bei Versuch 4. war zunächst gar kein Niederschlag entstanden, und selbst nach 3 stündigem Stehen hatte sich nur auf

der Oberfläche, offenbar infolge Verdunsten des Ammoniaks, eine häutige Ausscheidung gebildet.

Diese Versuche konstatieren eine so große lösende Wirkung des Ammoniaks auf Paraxanthinsilber, wie sie nicht erwartet werden konnte. Es soll zugegeben werden, daß man bei Fällungen mit Silbernitrat nicht bis zu so hohen Prozents an Ammoniak geht — bei Versuch 4) 5 % —, daß bei Anwesenheit noch anderer Purinkörper die Fällung des Paraxanthins eine vollständigere ist, daß endlich die nicht methylierten Purine mit größerer Anzahl substituierbarer Imidgruppen schwerer lösliche Silbersalze geben, jedenfalls aber bleibt der Einfluß des Ammoniaks bestehen. Es ist daher weiterhin nötig, die sämtlichen Purinkörper, welche physiologisches Interesse beanspruchen, quantitativ auf die Löslichkeit ihrer Silbersalze in Ammoniak zu prüfen.

II. Bestimmung der Harnsäure im Harn.

Schon in seiner zweiten Mitteilung¹⁾ über das Verhalten der Purinkörper zu Kupfersulfat und Bisulfit hat M. Krüger durch mehrere Versuche bewiesen, daß die Harnsäure im Harn ebenso gut mit dem genannten Reagens als mit ammoniakalischer Silberlösung nach Salkowski-Ludwig bestimmt werden kann. Die Isolierung der Harnsäure aus dem Kupferoxydulniederschlag geschah in derselben Weise wie beim Silberniederschlag durch Zersetzen mit Natriumsulfid und nachheriges Ansäuern mit Salzsäure. Die Menge der nach mehrstündigem Stehen aus der eingeeengten Flüssigkeit ausgeschiedenen Harnsäure wurde aus dem nach Kjeldahl ermittelten Stickstoffgehalte berechnet. Gefunden wurden damals:

	Nach Salkowski-Ludwig	Nach Krüger	Differenz
100 ccm Harn	0,0508 g Harnsäure	0,0504 g Harnsäure	0,4 mg
100 „ „	0,0442 „ „	0,0436 „ „ „)	0,6 „
100 „ „	0,0370 „ „	0,0369 „ „	0,1 „

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XX, S. 172 (1895).

²⁾ In der ursprünglichen Mitteilung befindet sich an dieser Stelle ein Druckfehler »0,0426 g« Harnsäure.

Die Differenz zwischen den Resultaten beider Methoden betrug daher in drei Versuchen weniger wie 1 mg. Da gemäß der ursprünglichen Vorschrift der Kupferniederschlag des Harnes erst nach zweistündigem Stehen abfiltriert werden sollte, so bot die neue Methode nur insofern einen Vorteil, als das im Vergleich zu der voluminösen Silberfällung geringe flockige Kupferpräzipitat leichter abfiltriert und ausgewaschen werden konnte. Nachdem sich aber die Vollständigkeit der Harnsäure- und Purinbasenfällung als unabhängig von der Dauer des Erkalstens und nur abhängig von der Zeit des Erwärmens erwiesen hat — auch der Zusatz des Chlorbaryums ist als unnötig befunden —, gewährt die Kupfermethode außer dem genannten Vorteil noch den einer wesentlichen Zeitersparnis.

Es wurden noch eine Reihe weiterer Analysen ausgeführt, um die Übereinstimmung in den Resultaten beider Methoden auch in den Fällen zu zeigen, wo die Kupferniederschläge sofort nach dem Erhitzen abfiltriert werden.

	Kupferfällung	Silberfällung
Harnsäure in 100 ccm Harn	0,0164 g; 0,0158 g	0,0158 g
	0,0474 »; 0,0496 »	0,0492 »
	0,0167 »; 0,0171 »	0,0169 »
	0,0826 »; 0,0814 »	0,0818 »
	0,0318 »; —	0,0316 »
	0,0524 »; 0,0515 »	0,0517 »
	0,0318 »; 0,0320 »	0,0286 »

III. Bestimmung der Purinbasen neben Harnsäure.

M. Krüger und P. Schmidt¹⁾ haben sich bei ihren Fütterungsversuchen mit Purinkörpern an Kaninchen und Hunden zur Isolierung der entstandenen Stoffwechselprodukte aus dem Harn des folgenden Verfahrens bedient: Der Harn wurde siedend heiß mit Kupfersulfat und Bisulfit gefällt und der Niederschlag mit Natriumsulfid zersetzt. Aus dem mit Schwefel-

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXII, S. 2681.

säure angesäuerten und eingeengten Filtrate fiel beim Erkalten die Hauptmenge der etwa vorhandenen Harnsäure heraus, der Rest wurde in essigsaurer Lösung durch Braunstein oxydiert. Nachdem das gelöste Mangan durch Ammoniak und Ammonkarbonat entfernt war, wurden dann in der mit Schwefelsäure neutralisierten Lösung die Basen wiederum mit Kupfersulfat und Bisulfit niedergeschlagen.

In dieser zweiten Kupferfällung sind niemals andere Körper als Purinbasen allein gefunden, sodaß die Trennung derselben keine Schwierigkeiten machte. Dasselbe gilt für einen von uns am Menschen mit Theobromin gemachten Versuch.¹⁾ Hier nach muß man annehmen, daß durch die Behandlung des ersten Kupferniederschlages mit Natriumsulfid, durch Eindampfen mit Mineralsäuren und endlich durch Oxydation mit Braunstein die zuerst beigemengten, stickstoffhaltigen, aber nicht zur Puringruppe gehörigen Verbindungen zerstört oder wenigstens so weit verändert werden, daß sie nicht mehr mit Kupferoxydul reagieren.

Wie groß ist der Unterschied im Stickstoffgehalte der ersten und zweiten Kupferfällung? Hierüber gibt folgender Versuch Aufschluß: In 100 ccm Harn wurde der angebliche Purinkörper-N nach Krüger-Wulff bestimmt. Dann wurde der Harnsäuregehalt von 300 ccm desselben Harnes mit dem Kupferverfahren ermittelt. Das Filtrat von der Harnsäure (75 ccm) wurde zur Beseitigung des Restes an Harnsäure mit Braunstein in essigsaurer Lösung oxydiert und dann mit Kupfersulfat und Bisulfit behandelt. Der Stickstoff dieses Niederschlages gibt den Purinbasen-Stickstoff an. Gefunden wurden, ausgedrückt in Kubikzentimetern $\frac{1}{10}$ N-Säure, folgende Zahlen:

1. Nach Krüger-Wulff in 100 Harn 22,61 ccm; in 300 ccm demnach 67,83 ccm.

2. Harnsäure in 300 Harn 52,37 ccm; mit Hinzurechnung der Korrektur für in 75 ccm Filtrat in Lösung gebliebene Harnsäure 53,27 ccm Basenstickstoff, im Filtrate von der Harnsäure = 4,29 ccm. Nach Krüger-Wulff sind in 300 Harn Basenstickstoff gefunden $67,83 - 53,27 = 14,56$ ccm, im

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXXII, S. 104 (1901).

Filtrate von der Harnsäure nur 4,29 ccm = 29,5 % vom ersteren Wert. Demnach sind 70,5 % des nach Krüger-Wulff ermittelten Stickstoffes bei den mit dem ersten Kupferniederschlage vorgenommenen Manipulationen zerstört worden.

Gibt nun die zweite Kupferfällung den richtigen Purinbasen-Stickstoff an, oder enthält sie immer noch fremde stickstoffhaltige Beimengungen, oder gibt sie zu niedere Werte an? Letzteres würde dafür sprechen, daß die Purinbasen selbst auf dem Wege bis zur zweiten Kupferfällung zum Teil zerstört werden.

Wie verhalten sich die Purinbasen gegen Säuren, Alkali und Braunstein? Durch Säuren wird der Stickstoff aller Purinkörper vollständig als Ammoniak und Amidosäuren abgespalten; jedoch geschieht dies nur durch starke Säuren, wie konzentrierte Salzsäure oder konzentrierte Schwefelsäure, welche mit dem doppelten Volumen Wasser verdünnt ist, und bei mehrstündigem Erhitzen unter Druck auf Temperaturen, welche weit über 100° liegen. Beim Eindampfen auf dem Wasserbade dagegen und bei Anwesenheit so geringer Mengen freier Säuren, wie im vorliegenden Falle ist eine Zerstörung der Basen völlig ausgeschlossen.

Die Einwirkung von Alkalien auf die Purinkörper hat E. Fischer einer eingehenden und systematischen Untersuchung unterzogen und gefunden, daß ihre Beständigkeit mit Zunahme der Methylgruppen abnimmt.¹⁾ Von den im Harn vorkommenden Purinbasen wird demnach das Paraxanthin am meisten unter dem Alkali zu leiden haben; von 0,4935 g dieser Base wurden bei 15 Stunden langem Erhitzen auf 100° mit 10 ccm N-Kalilauge 32 % zerstört. Diese anscheinend sehr beträchtliche Wirkung des Alkali auf das Paraxanthin ist zweifellos proportional der Länge der Zeit und abhängig von der Konzentration des Alkali.

Da nun die Umsetzung des Kupferniederschlags nach der Vorschrift in einer Lösung erfolgt, welche höchstens 0,15—0,20 % Natriumsulfid enthält, und dieselbe nur einen Zeitraum von etwa 1 Minute erfordert, so ist klar, daß eine

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXII, S. 500 (1899).

Zerstörung auch nur eines geringen Teiles der Basen hierbei nicht erfolgen kann, wie auch folgende Versuche beweisen.

In je 200 ccm Harn wurden die Harnsäure und Basen durch Kupfersulfat und Bisulfit gefällt; dann wurden die ausgewaschenen Niederschläge einmal durch Schwefelwasserstoffgas in saurer Lösung, der andere durch Natriumsulfid zersetzt. Beide Filtrate wurden bei saurer Reaktion eingedampft und nach Entfernung der Harnsäure in der oben angedeuteten Weise die Basen wiederum durch Kupfersulfat und Bisulfit gefällt. Die in der Tabelle angegebenen Zahlen bedeuten die Anzahl der nach Kjeldahl verbrauchten Kubikzentimeter $\frac{1}{10}$ -Normalsäure.

Harn	H ₂ S	Na ₂ S
1.	3,75 ccm	3,69 ccm
2.	4,13 „	4,29 „

Daß endlich auch die Harnsäure selbst trotz häufiger gegenteiliger Behauptungen nicht beim Erhitzen mit Natriumsulfid zersetzt wird, beweist die festgestellte Übereinstimmung in den Resultaten der Salkowskischen und der Ludwigschen Methoden.

Es bleibt noch übrig, den Einfluß des Braunsteins auf die Purinbasen zu ermitteln. Daß Harnsäure beim Erhitzen mit Braunstein in essigsaurer Lösung vollständig in das durch Kupfersulfat + Bisulfit nicht mehr fällbare Allantoin übergeführt werden kann, daß ferner Adenin bei gleicher Behandlung nicht angegriffen wird, somit eine quantitative Bestimmung des Adenins neben Harnsäure möglich ist, ist schon früher bewiesen worden.¹⁾ Die übrigen Purinbasen erweisen sich nun in gleichem Maße widerstandsfähig gegenüber der Oxydation mit Braunstein.

Vor den diesbezüglichen Resultaten mögen die Versuche erwähnt werden, durch welche festgestellt wurde, welcher Zeitraum der Erhitzung und welche Temperatur zur Zerstörung der geringen bei unserer Methode in Betracht kommenden Harnsäuremenge genügt.

Es wurden je 10 mg Harnsäure in 100 ccm H₂O mit 1—3 ccm 10^o/iger Essigsäure und 10 ccm einer Aufschwemmung von MnO₂ in Wasser (deren Herstellung s. Methode) zum Sieden

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXI, S. 317 (1896).

erhitzt. Nach Beendigung der Oxydation wurde der etwa vorhandene Rest der Harnsäure durch Kupfersulfat und Bisulfit ausgefällt. Es zeigte sich nun, daß in diesem Filtrerrückstand niemals N nachzuweisen, somit also die Harnsäure stets vollständig in Allantoin übergeführt war, gleichgültig ob ihre Lösung mit MnO_2 3 oder 1 Minute im Sieden erhalten wurde oder ob nach dem Erhitzen bis zum Siedepunkt die Flamme entfernt wurde und nunmehr der Braunstein eine Minute lang einwirkte.

Von Basen wurde neben Xanthin Heteroxanthin und Paraxanthin, von denen der geringste Widerstand gegen oxydierende Mittel vorausgesetzt werden konnte, der Einwirkung des MnO_2 unterworfen. Ihre Lösungen, deren Gehalt an Basen-N durch eine Cu-Fällung bestimmt wurde, wurden gleichfalls mit 1—3 ccm Essigsäure und 10 ccm Braunsteinlösung eine Minute lang in lebhaftem Sieden erhalten und dann mit Kupfersulfat und Natriumbisulfit gefällt. Die Zahlen der Tabelle geben den N-Gehalt der Fällung in $\frac{1}{10}$ N-Säure an.

Base	Cu-Fällung vor der Oxydation	nach Oxydation mit MnO_2 (1 Min.)
Xanthin	5,29 ccm	5,36; 5,20; 5,31 ccm
Heteroxanthin	4,97 „	4,69 ccm
Paraxanthin	4,52 „	4,45 „
„	9,44 „	9,38 „

Die Abweichungen beider Zahlenreihen liegen innerhalb der Versuchsfehlergrenzen.

Vergleich der Kupfer- und Silberfällung.

1. 600 ccm Harn mit Kupfersulfat und Natriumbisulfit gefällt; dann mit Natriumsulfid zersetzt und eingedampft. Filtrat mit NH_3 alkalisch, mit Essigsäure schwach sauer gemacht und mit MnO_2 oxydiert; mit Natriumkarbonat und Natronlauge versetzt und auf 200 verdünnt, davon 2 mal je 100 ccm abfiltriert.

a) mit CuSO_4 + Bisulfit gefällt, verbraucht 4,85 ccm
 b) mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt, verbraucht 4,75 ccm.

2. dieselbe Versuchsanordnung:

a) mit CuSO_4 + Bisulfit gefällt, verbraucht 7,89 ccm
 b) mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt, verbraucht 7,70 ccm.

3. je 600 ccm Harn:

a) Fällung mit CuSO_4 + Bisulfit (wie o.). Die Fällung der Basen mit CuSO_4 + Bisulfit: verbraucht 4,95 ccm.

Fällung der Basen mit Ag_2O : verbraucht 5,00 ccm.

b) Fällung mit ammoniakalischer Silberlösung. Die Fällung der Basen mit CuSO_4 + Bisulfit: verbraucht 5,05 ccm.

Fällung der Basen mit Ag_2O : verbraucht 4,86 ccm.

4. je 600 ccm Harn:

a) Fällung mit CuSO_4 + Bisulfit. Fällung der Basen mit Ag_2O -Lösung: verbraucht 4,72 ccm.

Fällung der Basen mit CuSO_4 : verbraucht 4,88 ccm.

b) Fällung mit ammoniakalischer Silberlösung. Fällung der Basen mit Ag_2O -Lösung: verbraucht 4,55 ccm.

Fällung der Basen mit CuSO_4 : verbraucht 4,69 ccm.

Die Analysen, denen noch mehrere mit gleichem Resultat angereicht werden könnten, ergeben, daß jede Kombination beider Methoden ohne Beeinträchtigung des Resultates möglich ist.

Damit glauben wir genügend Beweise erbracht zu haben für die Sicherheit, mit der das Kupferverfahren eine vollständige Ausfällung der Purinkörper verbürgt. Es gebührt dem Kupferreagens, welches durch die mißlungene Krüger-Wulffsche Methode in Mißkredit gekommen war, ein ebenbürtiger Platz neben dem Silberreagens. Diesem gegenüber ist es sogar überlegen in der Schnelligkeit, mit der die Niederschläge entstehen und weiter verarbeitet werden können.

Da die Ausführung unserer Methode bereits durch die Liebenswürdigkeit des Herrn Prof. Thierfelder in dem von ihm neubearbeiteten Hoppe-Seylerschen Lehrbuch Aufnahme fand, glauben wir an dieser Stelle auf eine detaillierte Wiedergabe verzichten zu dürfen.

Die Menge und Herkunft der Purinkörper in den menschlichen Faeces.

II. Mitteilung.

Von

Martin Krüger und Alfred Schittenhelm.

(Der Redaktion zugegangen am 23. April 1905.)

In unserer ersten¹⁾ Mitteilung über die Purinkörper der menschlichen Faeces hatten wir den Nachweis liefern können, daß außer den von Weintraud in den Faeces gefundenen Purinbasen Guanin, Hypoxanthin und Xanthin auch Adenin darin in beträchtlichen Mengen vorkommt und in unserem Fall mit Guanin zusammen bei weitem die Hauptmasse des Basengemisches ausmachte.

Da über die Menge der täglich mit dem Kot ausgeschiedenen Basen eigene Untersuchungen noch nicht vorlagen, so hatten wir uns begnügt, die diesbezüglichen Angaben von Weintraud und Petrén mitzuteilen, welche aber so stark von einander abweichen, daß eine Nachprüfung ihrer Angaben durchaus erforderlich war. Wir hatten die Erklärung ihrer auffallenden Unterschiede in der Anwendung verschiedener, zur Bestimmung der Basen dienender Methoden gesucht; hiernach sollte Weintraud mit der Kupfermethode zu hohe, Petrén dagegen bei Benutzung der Silbermethode zu niedere Werte erhalten haben.

Daß die Petrénschen Zahlen nicht die tatsächlich vorhandenen Mengen an Basen angeben können, hat schon unser zum qualitativen Nachweis der einzelnen Basen angestellter Versuch ergeben, bei welchem eine größere Menge derselben in reinem Zustande isoliert wurde, als nach Petrén im Höchstfalle überhaupt vorkommen sollte.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXV, S. 153.

Nach Durchsicht der Petrén'schen Originalarbeiten¹⁾ müssen wir leider bekennen, daß wir auf Grund der von ihm angewendeten Methode seinen quantitativen Werten eine Bedeutung überhaupt nicht beimessen können. Denn Petrén bestätigt ja nur, ohne ein Abhilfsmittel angeben zu können, die Schwierigkeiten und Fehler, welche allen Autoren, die sich mit der Silbermethode bei Isolierung von Basen aus Organextrakten beschäftigt haben, aufgefallen sind.

Es mag gestattet sein, hier etwas näher auf das Petrén'sche Verfahren einzugehen: Er kocht zunächst nach Weintraud'scher Vorschrift die Faeces mit verdünnter Schwefelsäure aus, neutralisiert genau mit Baryt. Dann aber wird das Filtrat mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht und mit ammoniakalischer Silberlösung versetzt. «Hier bot», sagt Petrén weiter,²⁾ «die Technik zuweilen einige Schwierigkeiten dar, indem die Silberfällung nicht immer sogleich erfolgte. Als Ursache dazu habe ich das — von mir wenigstens zuweilen in diesen Fällen nachgewiesene — Vorhandensein einer geringen Menge von Eiweiß in der Flüssigkeit angenommen; Kossel hat nämlich angegeben, daß Eiweiß das Ausfällen der Silbernitratverbindung des Hypoxanthins verhindert. Um in diesen Fällen die Silberfällung hervorzurufen, habe ich es geeignet gefunden, in der Weise zu verfahren, daß ich Salmiaklösung hinzugesetzt und die so entstehende Chlorsilberfällung durch vorsichtiges Hinzufügen von Ammoniak wieder gelöst habe, wonach die Xanthinsilbernitratfällung zurückgeblieben ist».

Hiernach ist Petrén die Tatsache, daß Eiweißkörper die Fällung der Silberverbindungen verhindern, bekannt. Will man nun deren schädlichen Einfluß beseitigen, so ist doch klar, daß dies nur durch Entfernen der Eiweißkörper selbst geschehen kann. Kossel koaguliert sie daher unseres Wissens durch Zusatz von Alkohol, Petrén findet es geeignet, in der beschriebenen Weise zu verfahren. Ja, glaubt den Petrén, durch Zusatz von Salmiak und Ammoniak die Eiweißkörper beseitigen zu können?

¹⁾ Skandinav. Arch. f. Physiol. 1898, Bd. VIII, S. 315 und 1899, Bd. IX, S. 412.

²⁾ l. c. S. 317.

Und wenn es ihm auch nun gelingt, durch den Niederschlag von Chlorsilber einen Teil der Silberverbindungen mit niederzureißen, womit ist denn bewiesen, daß nunmehr die Fällung der Basen eine vollständige und somit der Einfluß der Eiweißkörper aufgehoben ist? Versuche sind aber in dieser Richtung von Petrén nicht gemacht worden.

Doch kehren wir zum Petrén'schen Verfahren zurück. Auf Seite 321 sagt er weiter: «Um das Vorhandensein von Xanthinbasen in gallenfreien Faeces weiter zu bestätigen, legte ich bei einem Hunde eine Gallenfistel an. Bei den Analysen (drei verschiedenen) der von ihm bekommenen Faeces gelang es mir aber¹⁾ nicht, eine Alloxursilberfällung hervorzurufen. Das Schwefelsäureextrakt der Faeces hatte einen nicht ganz unbedeutenden Gehalt an Eiweiß; vielleicht könnte dies die Ursache sein, daß ich keine Fällung bekam. Ich wage also nicht zu schließen, daß keine Xanthinbasen hier vorhanden waren, besonders wenn ich dies Resultat mit den positiven Ergebnissen meiner Untersuchungen von gallenfreien Faeces bei Menschen zusammenstelle.»

Die Tatsache, daß Petrén selbst seiner Methode kein rechtes Vertrauen entgegenbringt, charakterisiert den Wert derselben wohl hinlänglich.²⁾

Es ist überhaupt bemerkenswert, daß, wie oft auch schon der störende Einfluß der Eiweißkörper und Nucleinstoffe auf die Abscheidung der Purinkörper durch ammoniakalische Silberlösung hervorgehoben worden ist, immer noch Arbeiten publiziert werden, in denen unter souveräner Verachtung der erwähnten Tatsache an interessierte Leser, bei denen man doch auch eine teilweise Kenntnis der einschlägigen Literatur voraus-

¹⁾ Verf. schreibt statt «aber» «doch».

²⁾ Einige neuere Arbeiten, welche nach Niederschrift der vorliegenden Mitteilung publiziert wurden (Galdi, Walker Hall u. a.), habe ich in einer inzwischen erschienenen Publikation «Die Purinkörper der Faeces nebst Untersuchungen über die Purinbasen der Darmwand, der Galle und des Pankreassaftes», Deutsch. Arch. f. klin. Med. 1904, Bd. LXXXI, S. 423, welche eine Fortsetzung und Erweiterung unserer gemeinsamen Versuche brachte, ausführlich berücksichtigt und kann daher auf ein Einfügen derselben an dieser Stelle verzichten.

A. Sch.

setzen darf, das Verlangen gestellt wird, die mit der Silbermethode erhaltenen Bestimmungen der Purinkörper für quantitativ zu halten.

Wie groß der schädliche Einfluß der Eiweißkörper auf die Silberfällung ist, darüber kann man sich leicht Aufschluß verschaffen, wenn man z. B. zu einer 1%igen Peptonlösung eine bestimmte Menge einer Purinbase setzt und nunmehr mit ammoniakalischer Silberlösung fällt. Der geringe, sich schwer absetzende Niederschlag zeigt ohne weiteres an, daß von einer vollständigen Fällung keine Rede sein kann. Zu je 100 ccm einer 1%igen Lösung von Wittes Pepton wurden je 15 g Adenin gesetzt und dann die Fällungen mit je 20 ccm einer 3%igen ammoniakalischen Silberlösung ausgeführt. Die nach 2stündigem Stehen abfiltrierten Niederschläge enthielten ihrem Stickstoffgehalte nach in dem einen Falle 1,7 g Adenin, in dem anderen 1,3 g. Demnach ist im Mittel aus 2 Versuchen nur der zehnte Teil des Adenins wiedererhalten worden.

Gerade die Peptone und Albumosen sind ja aber in großer Menge in den Extrakten der mit Säuren aufgeschlossenen Organe zu erwarten. Wenn diese Eiweißkörper nun in so starker Weise, wie das obige Beispiel zeigt, die Fällung der Purinkörper als Silberverbindungen beeinflussen, so kann man sich ungefähr ein Bild machen, wie zuverlässige Zahlen die Silberfällung in eiweißhaltigen Lösungen bisher geliefert hat. Andererseits aber hat die vergleichende Untersuchung der Wirksamkeit des Kupfer- und Silberreagens ergeben, daß die Peptone und Albumosen die Fällung der Purinkörper als Kupferoxydulverbindungen nicht verhindern, wohl aber daß ein Teil dieser Eiweißkörper (in Übereinstimmung mit den bisherigen Erfahrungen) dem Kupferniederschlag beigemischt wird.

Welchen Weg wird man nun zur Ermittlung der Basenmenge in Organen und in Faeces einschlagen? Darüber, daß die Organe und Faeces zunächst mit Säuren aufzuschließen und aus den Filtraten die koagulierbaren Eiweißkörper durch Kochsalz und Essigsäure, durch Baryt oder auf irgend einem anderen Wege zu entfernen sind, herrscht wohl keine Meinungsverschiedenheit. Gelänge es nun, auch den Rest der Eiweißkörper, die nicht.

koagulierbaren, durch ein Reagens von unzweifelhafter und durchsichtiger Wirkungsweise aus den Extrakten zu entfernen, so stände der Anwendung der Silberfällung nichts im Wege. Aber bei Durchsicht der zahlreichen Eiweißreagentien ergibt sich stets das Unmögliche eines solchen Verfahrens. Entweder werden die erwähnten Eiweißkörper nicht vollständig gefällt oder die Purinkörper werden mit niedergerissen. Demnach bleibt kein anderer Ausweg, als die Purinkörper zunächst mit dem Kupferreagens zu fällen, die Menge der Beimengungen an Eiweißkörpern im Niederschlage zu ermitteln und weiterhin einen Weg zu finden, wie diese Beimengungen zu entfernen sind.

Erwägt man nun, daß bei der Kupferfällung stets nur ein Teil der noch vorhandenen Eiweißkörper mitgefällt wird, so liegt der Gedanke nahe, zu prüfen, ob nicht — nach vorhergehender Isolierung der Basen und Eiweißkörper aus dem Niederschlage — bei einer nochmaligen Kupferfällung der Kupferniederschlag frei von Eiweißkörpern erhalten wird, oder ob eine an zweiter Stelle angewendete Silberfällung den richtigen Wert liefert. Wir vermuten somit, daß eine kombinierte Kupfer-Kupfer- oder Kupfer-Silbermethode zum Ziele führen wird.

Zur Prüfung dieser Frage wurden die folgenden Versuche ausgeführt:

Der Kot von einem Tage wurde nach Weintraud mit verdünnter Schwefelsäure gekocht, die schwefelsaure Lösung mit Barythydrat genau neutralisiert, abfiltriert und der Niederschlag gut ausgewaschen. Filtrat und Waschwasser wurden vereinigt und gemessen. In je 500 ccm der Flüssigkeit wurden dann die Basen mit Kupfersulfat und Bisulfit gefällt und der Stickstoffgehalt des Niederschlages nach Kjeldahl ermittelt. Es wurden in 2 Bestimmungen 0,0372 g und 0,0398 g, im Mittel 0,0385 g gefunden. Dieser Stickstoff ist nach Weintraud als Stickstoff der Purinbasen anzusehen.

Zur Bestimmung der Beimengungen an Eiweißkörpern wurde der aus einer weiteren Portion von 500 ccm Kotextrakt erhaltene Kupferniederschlag durch Natriumsulfid zersetzt. Aus dem Filtrate wurden nach dem Verjagen des Schwefelwasserstoffes die Basen nochmals mit Kupfersulfat und Bisulfit gefällt.

Der gut ausgewasene Niederschlag enthielt nun noch 0,0288 g Stickstoff. Da durch die Operationen, welche zwischen der ersten und zweiten Kupferfällung ausgeführt wurden, eine Zerstörung von Purinkörpern nicht stattfindet, worauf ebenfalls in der noch mitzuteilenden Arbeit näher eingegangen werden soll, so kommt die Differenz im Stickstoffgehalte der beiden Kupferfällungen allein auf das Konto der Beimengungen.

Ob nun endlich die zweite Kupferfällung den richtigen Wert für Purinbasenstickstoff angibt oder ob immer noch Verunreinigungen vorhanden sind, darüber kann nur ein Vergleich mit der Silberfällung Aufschluß geben. Eine vierte Portion des Kotextraktes von 500 ccm wurde daher zunächst in derselben Weise verarbeitet, wie in Versuch 3 angegeben, dann aber die zweite Fällung mit ammoniakalischer Silberlösung ausgeführt. Gefunden wurden 0,0279 g Stickstoff.

Aus dem vorliegenden Versuche geht mit Sicherheit hervor:

1. Daß die direkte Kupferfällung, wie sie von Weintraud zur Bestimmung des Basenstickstoffes ausgeführt wird, zu hohe Werte ergibt. Nach Weintraud sind bei unserem Versuche im Mittel gefunden 0,0385 g Stickstoff, nach dem kombinierten Kupfer-Silberverfahren 0,0279 g. Die Zahlen stehen im Verhältnis von 139 : 100;

2. daß die von Petrén erhaltenen Werte hinter den tatsächlichen um ein beträchtliches zurückstehen. Die von uns untersuchte Tagesmenge an Kot enthielt nicht weniger als 0,186 g Basenstickstoff, was 0,36 g Adenin entspricht. Bei Umrechnung des Stickstoffes in Basen auf Grund der von uns gefundenen Zusammensetzung des Kotbasengemisches würde selbstverständlich ein noch höherer Wert als 0,36 g herauskommen. Nach Petrén enthält aber die Tagesmenge des Kotes im Höchsfalle nur 0,1 g Basen.

Bei den ersten Versuchen der Basenbestimmung im Kote (s. o.) sind nach der Kupfer-Kupfermethode 0,0288 g N, nach der Kupfer-Silbermethode 0,0279 g N gefunden worden. In Übereinstimmung mit diesem Resultate ergab eine weitere vergleichende Untersuchung der beiden kombinierten Verfahren (s. u.) im Mittel aus 15 Doppelanalysen ein Plus von 0,18 ccm $\frac{1}{10}$ N-

Säure zugunsten der Kupfer-Kupfermethode. Die Annahme, daß diese Differenz immer noch das Vorhandensein geringer Verunreinigungen in der zweiten Kupferfällung anzeigt, erscheint aus dem Grunde nicht plausibel, weil sonst unverständlich bliebe, weshalb niemals größere Unterschiede gefunden werden, sondern stets nur dieselben innerhalb enger Grenzen liegenden Werte, obwohl doch die zu den einzelnen Versuchen verwandten Fäkalmassen natürlich im Gewichte starke Schwankungen zeigten. Nach unserer Ansicht kommt in der genannten Differenz vielmehr die anerkannte Überlegenheit der Kupferfällung über die Silberfällung zum Ausdruck.

In der nachfolgenden Tabelle ist der Basenstickstoff in Kubikzentimeter $\frac{1}{10}$ N-Säure (nach Kjeldahl verbraucht) ausgedrückt.

Basen-N in Faeces verschiedener Herkunft:

Cu - Cu-Methode	Cu - Ag-Methode
12,74 ccm	12,74 ccm
7,76 >	7,90 >
10,12 >	10,11 >
3,55 >	3,32 >
2,57 >	2,44 >
4,60 >	4,80 >
4,46 >	4,29 >
9,40 >	9,11 >
1,40 >	1,20 >
6,70 >	6,35 >
10,70 >	11,— >
8,53; 8,41 ccm	8,28 >
7,36 ccm	7,22 >
3,43 >	3,43 >
2,68 >	2,31 >
2,11 >	2,06 >

Es mag noch erwähnt werden, daß im Laufe dieser Versuche noch manche Verbesserungen an der Methode gemacht wurden, sodaß in Zukunft eine noch größere Übereinstimmung zu erwarten ist.

Nach den vorliegenden Versuchen eignen sich beide kombinierten Methoden zur Bestimmung der Basen. Wenn wir trotzdem dem Kupfer-Silberverfahren einstweilen den Vorzug geben, so geschieht es in der Erwägung, daß bei demselben

zwei verschiedene Fällungsmittel für Basen zur Anwendung kommen, von denen jedes die Fehlerquellen des anderen ausschließt. Sollten jedoch auch weitere Versuche die Gleichwertigkeit beider Methoden ergeben, so wäre die Kupfer-Kupfermethode ihrer Einfachheit wegen vorzuziehen.

Methode zur Bestimmung der Purinbasen im Kote.

Die Methode der Basenbestimmung, wie sie endgültig von uns angewendet wurde, ist folgende:

Der Kot wird zunächst nach Angabe von Weintraud durch Kochen mit verdünnter Schwefelsäure aufgeschlossen. Zu dem Zwecke erhitzt man denselben je nach seiner Menge mit 1—2 Liter Wasser, dem 10—20 ccm konzentrierter Schwefelsäure zugefügt sind, mehrere Stunden über freiem Feuer. Die weitere Verarbeitung der schwefelsauren Lösung geschah aber nicht nach der schon oben erwähnten Vorschrift von Weintraud, obwohl dieselbe ein klares, verhältnismäßig wenig gefärbtes Filtrat liefert; denn das Auswaschen des voluminösen Barytniederschlags erhöht die Filtratmengen, sodaß ein Eindampfen derselben vor der Basenfällung nötig wird.

Die schwefelsaure Lösung wurde vielmehr mit Natronlauge deutlich alkalisch gemacht, dann mit 10, resp. 20 ccm Eisessig sauer gemacht und kurze Zeit auf dem Wasserbad erhitzt. Gleichzeitig wurden zur Ausfällung des Kalkes 5, resp. 10 g Oxalsäure hinzugegeben. Nach dem Erkalten der Flüssigkeit wurde dieselbe auf ein bestimmtes Volumen, 1500, resp. 3000 ccm, aufgefüllt, durch ein trockenes Faltenfilter vom körnigflockigen, sich leicht absetzenden Niederschlag abfiltriert und ein gemessener Teil des Filtrates zur Basenbestimmung verwendet. In den Fällen jedoch, wo der Niederschlag sehr groß erscheint, empfiehlt sich auch hier ein Auswaschen, indem man denselben mit heißem Wasser vom Filter spritzt, was leicht vonstatten geht, und noch einmal mit Natriumacetat und essigsäurehaltigem Wasser digeriert. Die vereinigten Filtrate brauchen nicht eindampft zu werden; man nimmt nur für die weitere Behandlung entsprechend größere Mengen in Arbeit.

Ein gemessener Teil des essigsauren Filtrates, mindestens 500 ccm, wird in einem Rundkolben zunächst mit Natronlauge schwach alkalisch gemacht, dann gibt man pro 100 ccm je 10 ccm käufliche, 40%ige Natriumbisulfatlösung hinzu und erhitzt zum Sieden. Die heiße Flüssigkeit versetzt man weiterhin pro 100 ccm mit je 10 ccm 10%iger Kupfersulfatlösung und erhält sie noch wenigstens drei Minuten im Sieden. Der flockige Niederschlag wird sofort durch ein Faltenfilter abfiltriert, mit heißem Wasser ausgewaschen, und möglichst bald, um ein Antrocknen desselben auf dem Filter zu verhüten, mit heißem Wasser in den Fällungskolben zurückgespritzt. Man kann auch zweckmäßig den Niederschlag mitsamt dem Filter in den Kolben zurückbringen; durch kräftiges Schütteln des Kolbeninhaltes mit Wasser wird dann der Kupferniederschlag so fein verteilt, daß die zersetzenden Mittel, Schwefelwasserstoff resp. Natriumsulfid, um so besser einwirken können. In jedem Falle wird die den Niederschlag enthaltende Flüssigkeit zum Sieden erhitzt, dann gibt man von einer aus 1%iger Natronlauge hergestellten Natriumsulfidlösung so viel hinzu, bis ein Tropfen der Flüssigkeit Bleiacetatpapier deutlich braun färbt. Die Wirkung des Natriumsulfids wird durch ein mehrere Minuten fortgesetztes Sieden unterstützt; dann säuert man mit 10%iger Essigsäure an, setzt das Sieden fort, bis das Kupfersulfid sich leicht in Flocken zusammenballt und die überstehende Flüssigkeit möglichst klar ist.¹⁾ Nachdem der Niederschlag von Kupfersulfid durch ein Saugfilter abfiltriert und mit heißem Wasser ausgewaschen

¹⁾ An anderer Stelle (Arch. f. klin. Med., Bd. LXXXI, S. 428) habe ich angegeben, daß im Notfall, wenn die überstehende Flüssigkeit absolut nicht klar werden will, ein Zusatz einiger Kubikzentimeter einer gesättigten Aluminiumacetatlösung, wie es Wiener im Arch. f. exp. Pathol. und Pharmakol., 1899, Bd. XLII, S. 373 angibt, an Stelle des Ansäuerns mit Essigsäure in jedem Falle eine Klärung derselben ermöglicht. Man muß allerdings bei dieser Modifikation, wie darauf hinzielende, unter meiner Leitung von Herrn Dr. Ritter angestellte Versuche ergeben haben, auf Verluste gefaßt sein. Zur möglichsten Vermeidung derselben ist es notwendig, sich nicht mit dem einfachen Auswaschen des voluminösen Niederschlags zu begnügen, sondern an Stelle desselben ein mehrmaliges Auskochen zu setzen.

A. Sch.

ist, dampft man das Filtrat unter Zusatz von 10 ccm 10%iger Salzsäure bis zur Trockne ein. Der Rückstand wird, um die Basen wieder in Lösung zu bringen, mit 5 ccm Salzsäure und etwas Wasser auf dem Wasserbade digeriert.

Nach dem Erkalten filtriert man von dem geringen, aus Schwefel und braunen, humusartigen Flocken bestehenden Rückstand ab und wäscht ihn mehrmals mit Wasser aus. In dem Filtrate, welches etwa 80 ccm beträgt, können die Basen mit Hilfe der Kupfer- oder Silberfällung bestimmt werden. Die Fällungen geschehen in derselben Weise, wie es von dem einen von uns (Krüger) in Gemeinschaft mit J. Schmid beschrieben ist (vergleiche Hoppe-Seyler-Thierfelder, Handbuch der physiologisch- und pathologischchemischen Analyse, 7. Auflage, S. 436, 2a und b),¹⁾ nur daß hier bei Abwesenheit von Harnsäure die Oxydation derselben mit Braunstein in essigsaurer Lösung wegfällt.

1. Fällung mit dem Kupferreagens.

Das Filtrat wird zum Sieden erhitzt, mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht und mit 10 ccm Natriumbisulfatlösung angesäuert. Dann fügt man 5—10 ccm 10%ige Kupfersulfatlösung hinzu, erhält die Flüssigkeit noch 3 Minuten im Sieden, filtriert durch ein Faltenfilter aus schwedischem Papier von J. H. MunkteIl Nr. 1, wäscht den Niederschlag mit heißem Wasser aus und bestimmt den Stickstoffgehalt desselben nach Kjeldahl.

2. Fällung mit dem Silberreagens.

Das Filtrat wird mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht, mit 10 ccm ammoniakalischer Silberlösung und 20 ccm 10%igem Ammoniak versetzt. Um das Absitzen und Auswaschen des voluminösen Silberniederschlags zu begünstigen, erzeugt man gleichzeitig in der Flüssigkeit einen Niederschlag von Magnesiumammoniumphosphat durch Hinzufügen von 10 ccm 6%iger Dinatriumphosphatlösung und 5 ccm der üblichen Magnesia-

¹⁾ Die Methode ist in der vorstehenden Mitteilung von M. Krüger und J. Schmid des näheren ausgeführt.

mischung. Nach zweistündigem Stehen filtriert man den Niederschlag ab, wäscht ihn mit Wasser möglichst ammoniakfrei, spritzt ihn mit heißem Wasser in einen Rundkolben und verreibt das Ammoniak durch Kochen unter Zusatz von Magnesia etc. Endlich wird in der rückständigen Flüssigkeit eine N-Bestimmung nach Kjeldahl ausgeführt. Es empfiehlt sich hier, beim Eindampfen der mit Schwefelsäure versetzten Flüssigkeit etwas Talkum zur Verhütung des Stoßens hinzuzufügen.

Wie oben erwähnt, fällt man gleichzeitig mit den Eiweißkörpern aus dem Faecesextrakt den Kalk durch Zugabe von 5—10 g Oxalsäure aus. Bei Anwesenheit von Kalk würde sonst der Kupferfällung schwefligsaurer Kalk beigemischt sein, der späterhin durch Zersetzung großer Mengen von Natriumsulfid, Ausscheidung von Kalksalzen etc. sich unangenehm bemerkbar machen würde. Nun zeigt aber bei Gegenwart von Oxalsäure die Kupferfällung ein ganz anderes Aussehen. Der Niederschlag färbt sich schwerer braun und die Flüssigkeit nimmt eine auffallende dunkelblaugrüne Färbung an. Die Vermutung, daß Oxalsäure die Fällung zu einer nicht quantitativen machen könnte, wurde jedoch nicht bestätigt. Eine Lösung der 4 Nucleinbasen, welche in 50 ccm 6,02 ccm $\frac{1}{10}$ N-Säure entsprechend Stickstoff enthielt, wurde in 2 Portionen zu je 50 ccm mit Kupfersulfat und Bisulfit bei Gegenwart von je 1 g Oxalsäure behandelt. Die Erscheinungen bei der Fällung waren die oben beschriebenen. Die Niederschläge enthielten Stickstoff, 6,05 und 6,01 ccm entsprechend. Bei 2 Silberfällungen, ebenfalls in Gegenwart von je 1 g Oxalsäure, wurden erhalten 5,97 und 6,00 ccm. Dieselben Versuche wurden mit den Lösungen der einzelnen Nucleinbasen ausgeführt und ergaben gleichfalls quantitative Resultate.

In der mitgeteilten Tabelle der Analysenzahlen befinden sich eine Reihe kleiner, von acholischen Stühlen herrührender Werte. Es ist wohl selbstverständlich, daß man in solchen Fällen den Auszug aus der Tagesmenge an Kot besser nur in 2 Teile teilt.

Die Herkunft der Purinkörper in den Faeces.¹⁾

Nachdem Weintraud die Nahrung als Quelle der Purinkörper des Kotes durch seine Untersuchungen ausgeschlossen hat, kommt er zu dem Schlusse, daß dieselben von der Darmwand und den großen, in den Darm mündenden Drüsen herkommen. Da auch der gallenarme Stuhl eines Gelbsüchtigen die Basen enthielt, so kommt jedenfalls die Galle nicht als einzige Bezugsquelle in Betracht. Ja, Petrén findet weder in der Galle (wenigstens beim Rinde), noch in dem darin enthaltenen Nucleoalbumin Purinbasen und schließt somit die Galle überhaupt aus. Da aber Petrén seine Resultate mit dem oben erwähnten nicht quantitativen Verfahren erhalten hat, so bedürfen seine Angaben einer Nachprüfung. Wir haben aber mit unserer kombinierten Methode gleichfalls weder in der Galle des Rindes, noch in der des Menschen Purinbasen finden können und müssen uns somit der Ansicht von Petrén, daß mit der Galle keine Purinbasen in den Darm ausgeschieden werden, anschließen.

Wie steht nun hiermit die Tatsache im Einklang, daß in gallenfreien Stühlen die Menge der Basen außerordentlich gering ist? So wurden in 2 Fällen folgende Resultate erhalten:

¹⁾ Zu diesem Teile der Untersuchungen verweise ich nochmals auf meine inzwischen publizierte, schon oben erwähnte ausführliche Mitteilung im Arch. f. klin. Med., Bd. LXXXI. Ich bemerke an dieser Stelle nur, daß auf Grund meiner Versuche in Übereinstimmung mit denen Walker Halls (A Contribution to the Knowledge of the Purin Bodies of Human Faeces in Health and Disease. The Journal of Patholog. and Bacteriol., March 1904) die Nahrungspurine für die Zusammensetzung der Faeces in mancherlei Hinsicht einen wesentlichen Faktor bilden, wenn sie auch andererseits bei Magen-Darmgesunden unter einer gemischten, an Purinkörpern (wie z. B. bei Genuß von Kalbsbries) nicht überreichen Kost als Quelle der Kotpurine wegfallen. Sodann ist auch auf die von C. Tollens und mir (Untersuchungen über den quantitativen Anteil der Bakterien an Stickstoff und Purinbasen der Faeces, Zentralbl. f. inner. Med., 1904) inzwischen gefundene Tatsache Rücksicht zu nehmen, daß von den Kotpurinen bis zu 25% ihre Herkunft den in den Darmbakterien enthaltenen Purinkörpern verdanken können.

A. Sch.

Icterus. Echinoc. hepat. Herr N.

1. Tageskot	0,0279 g Basen-N	Patient hat täglich
2. „	0,0205 „	reichlichen farblosen
3. „	0,0237 „	Kot.

Icterus. Herr Gr.

Kot vom 1. Tag	enthält 0,0765 g Basen-N.	Kot leicht braun gefärbt.
„ 2. „	0,0108 „	Kot völlig entfärbt.

Der Basen-N-Gehalt der Tagesmenge an Kot schwankt bei dem ersten Patienten von 0,0205 g bis 0,0279 g. Besonders lehrreich ist der zweite Fall: Hier enthält der Kot des ersten Tages bei Anwesenheit von geringen Mengen an Gallenbestandteilen noch 0,0765 g Basen-N, am nächsten Tage aber enthält der völlig entfärbte Kot nur noch 0,0108 g. Die Verstopfung des Gallenganges erniedrigt also den Basengehalt des Kotes in auffallender Weise, aber nicht deshalb, weil mit dem Abschluß der Gallenzufuhr eine Quelle der Basen verschwindet. Wenn aus den angeführten Gründen als Quelle der Kotbasen nur noch die Darmschleimhaut und das Pankreas in Betracht kommen, so ist der Beweis dafür bisher nur in indirekter Weise erbracht worden, insofern als andere Bezugsquellen, wie Nahrung und Galle, ausgeschlossen worden sind. Ein direkter Beweis aber, daß die Kotbasen, wenigstens zum größeren Teil, ihre Existenz nur der sekretorischen Tätigkeit von Organen verdanken können, ist durch die qualitative und quantitative Zusammensetzung des Basengemisches gegeben. Dasselbe enthält, wie wir in der ersten Mitteilung gezeigt haben, alle 4 Nucleinbasen in solcher Verteilung, daß Guanin und Adenin bei weitem die Hauptmenge ausmachen. Genau derselbe Befund wurde von uns bei der Untersuchung von Organen gemacht. Leber, Milz, Pankreas vom Rind, Kalbsthymus und nach vorläufiger Untersuchung auch die Darmschleimhaut des Rindes enthalten gleichfalls alle 4 Nucleinbasen, vorherrschend auch hier Guanin und Adenin. In einer aus Muskelfleisch, Fett und Kohlehydraten bestehenden Nahrung andererseits kommt eigentlich nur das Hypoxanthin in Betracht und es müßte somit, wenn die Purinbasen der Nahrung und des Kotes in näherer Beziehung ständen, vornehmlich die letztere Base gefunden werden. Da dies aber

nicht der Fall ist, vielmehr die quantitative Verteilung der einzelnen Purinbasen in dem in den Faeces gefundenen Gemisch demjenigen am allernächsten steht, das in den Organen von uns gefunden wurde, so ergibt sich daraus klar und deutlich, daß die hauptsächliche Quelle derselben wohl in diesen selbst resp. deren Sekreten zu suchen ist. Nach Ausschluß der Leber, die ja mit der Galle keine Basen liefert, kommen aber vornehmlich nur Darm und Pankreas in Betracht, welche somit den größeren Teil der Purinbasen des Kotes liefern dürften.¹⁾

¹⁾ Dieses Resultat ist durch meine späteren Untersuchungen (l. c.) vollauf bestätigt worden. Doch stammen die Purinkörper, welche der Darm liefert, nicht nur aus seinen Sekreten, sondern der größere Teil verdankt wohl seine Herkunft der beständigen mechanischen Abschilferung seiner oberen Epithellage, deren Quantität je nach der Zusammensetzung der Nahrung und damit der Qualität der Nahrungsschlacken wechselt. Grobe vegetarische Kost reißt mechanisch mehr Epithelien mit, wie die reizlosere Eiweiß- und Fettkost und es dürfte daher auch die Vermutung zutreffen, daß wenigstens eine Ursache des geringen Basengehaltes vom acholischen Stuhl darin liegt, daß dessen hoher Gehalt an Fett, welches alle unebenen und dadurch die Darmwand mechanisch lädierenden Nahrungsschlacken mit einer schützenden Hülle umgibt, ein schonenderes Durchtreten des Kotes durch den Darm veranlaßt. Der dadurch bedingte Anfall der Darmwandepithelien bedingt dann natürlich ein Absinken der Gesamtbasenmenge des Kotes.

A. Sch.

Beiträge zur Kenntnis der Pankreassekretion beim Menschen.

Von

Alexander Ellinger und cand. med. Max Cohn.

(Aus dem Universitätslaboratorium für medizinische Chemie und experimentelle
Pharmakologie zu Königsberg i. Pr.)

(Der Redaktion zugegangen am 23. April 1906.)

Die Untersuchungen der Pawlowschen Schule, namentlich die von Wassilief,¹⁾ A. A. Walter²⁾ und Lintwarew³⁾ haben gezeigt, daß die Menge des sezernierten Pankreassaftes und seine quantitative Zusammensetzung hinsichtlich des Fermentgehalts bei Hunden eine weitgehende Abhängigkeit von der den Versuchstieren zugeführten Nahrung zeigt. Diese Errungenschaft der Pawlowschen Methodik ist unbestritten, wenn auch die Anschauung Pawlows,⁴⁾ welcher in der Arbeit der Bauchspeicheldrüse eine ausgesprochene Zweckmäßigkeit sieht, nicht allseitig anerkannt und namentlich von Popielski⁵⁾ lebhaft bekämpft wird. Die für die menschliche Physiologie wie Pathologie gleich wichtige Frage, ob eine solche Abhängigkeit auch für die Absonderung der menschlichen Bauchspeicheldrüse besteht und ob sie ähnlichen Gesetzen folgt wie beim Hunde, ist, soweit uns bekannt geworden ist, bisher noch nicht geprüft. Die Gründe dafür liegen nahe genug. Erst vor wenig mehr als einem Jahr ist ein menschliches Pankreassekret der physiologisch-chemischen Analyse zugänglich geworden, welches mit größter Wahrscheinlichkeit als normal angesehen werden darf (Glaeßner).⁶⁾ Was

¹⁾ Archives des sciences biolog. St. Petersburg, Bd. II, S. 219 (1893).

²⁾ Ebenda, Bd. VII, S. 1 (1899).

³⁾ Zitiert nach Biochem. Zentralbl., Bd. I, S. 201.

⁴⁾ J. P. Pawlow, Die Arbeit der Verdauungsdrüsen, Wiesbaden 1898, vgl. namentlich Kap. II.

⁵⁾ Zentralbl. f. Physiologie, Bd. XVII, S. 65 (1903).

⁶⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XL, S. 465.

vorher von menschlichen Pankreasabsonderungen chemisch untersucht wurde, war nicht aus dem Ductus Wirsungianus einer intakten Drüse abgeflossen, sondern stammte aus Pankreasfisteln nach Verletzungen oder Erkrankungen des Organs oder aus Pankreascysten.

Aus der Untersuchung solcher Sekrete irgend welche Schlüsse auf normale Verhältnisse zu ziehen, war unzulässig, solange ein Vergleich mit normalem Pankreassaft unmöglich war. Nachdem nunmehr durch Glaeßners Arbeit eine — freilich noch recht schmale — Grundlage geschaffen ist, darf man es eher wagen, auch die Absonderungen der oben genannten Fisteln für physiologische Fragen zu verwerten, vorausgesetzt, daß die chemische Zusammensetzung jener Sekrete mit dem normalen Übereinstimmung zeigt. Schon die bis jetzt vorliegenden Literaturangaben rechtfertigen nun die Behauptung, daß auch nach der Operation von Pankreascysten Fistelsekrete vorkommen, welche der genannten Anforderung genügen. Die gründlichste quantitative Untersuchung solcher Sekrete verdanken wir O. Schumm,¹⁾ welcher auch die früher bearbeiteten Fälle zusammengestellt und besprochen hat. Wie Glaeßner selbst in einer Vergleichstabelle zeigt, ergibt sich für die Zusammensetzung des von ihm untersuchten Pankreassaftes und der von Schumm analysierten Sekrete in vielen Punkten gute Übereinstimmung.

Auf Grund dieser Tatsachen schien es uns nicht wertlos, das Sekret einer menschlichen Pankreasfistel nach Cystenoperation auf seinen Gehalt an Fermenten bei verschiedener Diät zu untersuchen, nachdem wir uns durch die Analyse überzeugt hatten, daß es dem normalen Pankreassaft und dem von Schumm untersuchten Sekrete hinreichend ähnlich war. Die Gelegenheit zu längerer Beobachtung von stark sezernierenden Pankreasfisteln dürfte nicht allzu häufig sein. Deshalb glaubten wir das kasuistische Material veröffentlichen zu sollen, obwohl wir uns der Unvollkommenheit unserer Beobachtungen wohl bewußt sind. Vielleicht können spätere Beobachter, die mit einem ähnlichen Versuchsplan und mit gleicher oder besserer Me-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVI, S. 292.

thodik arbeiten, unsere Beobachtungen zum Ausbau der Lehre von der Aufgabe, welche der pankreatischen Verdauung beim Menschen zukommt, verwerten.

Der Fall, über welchen wir berichten, stammt aus der chirurgischen Abteilung der städtischen Krankenanstalt zu Königsberg i. Pr. Wir sprechen dem dirigierenden Arzt derselben, Herrn Professor O. Samter, sowie seinen Assistenten für die lebenswürdige Unterstützung, die sie unsern Untersuchungen zuteil werden ließen, unsern verbindlichsten Dank aus. Herr Professor O. Samter wird über den auch klinisch interessanten Verlauf der Krankheit an anderer Stelle selbst berichten. Hier seien nur kurz folgende Daten der Krankengeschichte wiedergegeben, die für die Beurteilung der Verwertung des Patienten zum physiologischen Versuche uns von Bedeutung erscheinen:

Fr., 20 Jahre alt, Telegrammbesteller, fuhr am 23. IV. 04 auf dem Fahrrad gegen eine Wagendeichsel, so daß er in die regio epigastrica gestoßen wurde. Am 25. IV. Aufnahme. Schmerzen, Meteorismus, objektiv sonst nichts nachzuweisen. Bettruhe. Im Laufe der vierten Woche bildete sich eine perkutorisch und palpatorisch nachweisbare Bauchgeschwulst im Bereich des Epigastriums und linken Hypochondriums aus, welche, wie die am 2. Juni vorgenommene Laparotomie ergab, eine in der Bursa omentalis gelegene Cyste darstellte. An der Hinterwand derselben lag das Pankreas, welches auf einer zweiten cystischen Geschwulst schwamm. Diese wölbte sich nach oben gegen das Omentum minus vor. Beide Cysten wurden, da bei der Operation eine Kommunikation zwischen ihnen sich nicht auffinden ließ, selbständig eröffnet. Die Einnähung der Cysten in die Bauchwand erfolgte so, daß die tiefere Cyste konzentrisch innerhalb der oberflächlichen angenäht wurde. Mittels eines Drainrohrs wurde die sezernierte Flüssigkeit nach außen geleitet.

Die Heilung erfolgte im Laufe von etwa einem halben Jahre. Entlassung am 26. XI. 04. — Wie aus der Tabelle I zu ersehen ist, verminderte sich am 4. VI. die Sekretion und stockte einige Tage vollständig. Am 9. VI. setzte die Absonderung wieder ein, sank am 22. VII. wieder sehr stark ab, um dann dauernd zu versiegen.

Der Saft wurde an den Versuchstagen in sterilen Gefäßen aufgefangen, sonst wurde öfters nur ein wenig Chloroform in die Vorlage gebracht. Er war fast ausnahmslos wasserklar und enthielt nur zuweilen kleine Fibrinrinnsel oder Blutspuren.

Die vom Tage der ersten Untersuchung an abgesonderten Flüssigkeitsmengen waren die folgenden:

Tabelle I.

Datum	Saftmenge in ccm	Datum	Saftmenge in ccm	Datum	Saftmenge in ccm
21.—22. VI.	400	1.—2. VII.	315	*14.—15. VII.	220
22.—23. VI.	400	(20 Stunden)		15.—16. VII.	60
23.—24. VI.	350	2.—4. VII.	580	*16.—17. VII.	185
24.—25. VI.	306	(42 Stunden)		17.—18. VII.	185
25.—27. VI.	695	4.—5. VII.	150	18.—19. VII.	320
(42 Stunden)		6.—9. VII.	—	19.—21. VII.	440
27.—28. VI.	415	9.—10. VII.	385	(40 Stunden)	
*28.—29. VI.	339	10.—11. VII.	400	21.—22. VII.	105
29.—30. VI.	327	11.—12. VII.	165	(32 Stunden)	
*30. VI.—1. VII.	442	12.—14. VII.	142	22.—24. VII.	15

Anm.: Wenn bei dem Datum nichts Besonderes bemerkt ist, so ist die Saftmenge innerhalb 24 Stunden ausgeschieden. Die Sternchen * bezeichnen Versuchstage.

Chemische Zusammensetzung des Sekrets.

Von dem am 22.—23. VI. (I) und am 19.—21. VII. (II) abgesonderten Saft wurde der Trockenrückstand und der Gesamtstickstoff, von Saft I außerdem Globulin und Albumin getrennt, von Saft II das koagulierbare Eiweiß, sowie die in Alkohol löslichen und unlöslichen Bestandteile bestimmt. Die angewandten Methoden waren die von Glaeßner. Die Ergebnisse finden sich in der folgenden Tabelle, welcher die entsprechenden Werte aus den Arbeiten von Schumm und Glaeßner beigegeben sind.

Tabelle II.

In 100 Teilen	Portion I	Portion II	Schumm Portion B	Glaeßner Portion a	Glaeßner Portion b
Wasser	98,8618	98,7386	98,4551	98,7292	98,7516
Trockenrückstand .	1,1382	1,2614	1,5449	1,2708	1,2494
N-Gehalt	0,084	0,0765	0,0804	0,0983	0,0842
Koaguliertes Eiweiß	—	0,1374	0,099	0,1744	0,1276
In Alkohol löslich .	—	0,4240	0,5611	0,5080	0,4216
Globulin	0,0496	—	—	0,0655	0,0410
Albumin	0,0218	—	—	0,1079	0,0866
Spez. Gewicht . .	1,008	1,008	1,0098	1,00748	1,00755

Während also die quantitative Zusammensetzung des Saftes in bezug auf die in der Tabelle angegebenen Bestandteile eine weitgehende, wenn auch keineswegs vollständige Übereinstimmung mit den Untersuchungsobjekten von Schumm und Glaeßner zeigte, ergab die Prüfung auf die Fermente, daß nur in qualitativer Beziehung sich unser Saft wie der von Glaeßners Fall verhielt, daß aber die Stärke der Fermentwirkung geringer war.

Das proteolytische Ferment war niemals vorgebildet im Sekret vorhanden, sondern äußerte seine Wirkung stets nur nach Zusatz von Enterokinase¹⁾ Lösung. Wir benutzten ein unter Chloroform- und Toluolzusatz bereitetes Extrakt aus menschlicher Jejunumschleimhaut mit 0,2 % iger Salzsäure, welches nach 24stündigem Stehen filtriert war. Zur quantitativen Bestimmung wurden die Mettschen Röhren stets in ein Gemenge im Verhältnis von 2 ccm Saft, 1 ccm Kinase²⁾ Lösung und 2 Tropfen Sodalösung gebracht und die Länge der verdauten Eiweißsäulen mittels Okularmikrometer nach 24 Stunden abgelesen. Der beobachtete Maximalwert betrug 6,4 mm, während Glaeßner 10 mm fand, wobei allerdings in Betracht zu ziehen ist, daß Glaeßner, welcher als Kinase²⁾ Lösung einen offenbar sehr wirksamen Darmpreßsaft benutzte, das Pankreassekret fast unverdünnt einwirken ließ.

Das diastatische Ferment wurde bei den Versuchen mit verschiedener Diät nach der Methode von Walter³⁾ bestimmt, welcher den Mettschen Eiweißröhren nachgebildete, mit gefärbtem Stärkekleister gefüllte Röhrchen benutzte. Wir richteten uns bei der Herstellung der Röhrchen genau nach Walters Vorschrift, nur wurde der Stärkekleister etwas dünner genommen (1,5 auf 25 ccm Wasser). Die Länge der verdünnten

¹⁾ Das Fehlen fertig gebildeten Trypsins habe ich inzwischen auch in zwei weiteren Fällen konstatieren können; einmal in einer Pankreas-cyste, das andere Mal in dem sehr spärlichen Sekrete nach einer Naht des Pankreas, welche mit dem besten Erfolge nach einer Zerreißung des Organs ausgeführt war. Beide Untersuchungsobjekte verdanke ich der Freundlichkeit des Herrn Geh. Rats Prof. Garré. Ellinger.

²⁾ l. c. S. 17.

Stärkesäule wurde nach $1\frac{1}{4}$ Stunde abgelesen. Um einen Vergleich auch mit den Werten Glaeßners zu haben, wurde in einem Falle die Verzuckerung eines 3%igen Stärkekleisters beobachtet. Nach einstündiger Einwirkung waren etwa 1,5 g Maltose gebildet (polarimetrische Bestimmung des in starkem Alkohol löslichen Teils des Reaktionsprodukts und Invertierung der Lösung mit Salzsäure, abermalige polarimetrische Bestimmung des gebildeten Traubenzuckers).

Auch zur Bestimmung des fettsplattendenden Ferments hielten wir uns in der Hauptsache an Walters¹⁾ Vorschriften. Nur wurde zur Filtration $\frac{n}{20}$ -KOH-Lösung benutzt. Die in den Tabellen angegebenen Werte sind stets durch Abzug der bei einem blinden Versuch mit gekochtem Saft verbrauchten Anzahl Kubikzentimeter von den tatsächlich verbrauchten gewonnen. Vergleichsbestimmungen zu den Werten von Glaeßner unter Einhaltung der von ihm gewählten Bedingungen zeigten, daß durch unsern Saft nur etwa 10–15% Ölsäure gebildet wurden, gegen 24–30% in seinem Falle.

Die Alkaleszenz des Saftes war im nüchternen Zustand ungefähr die gleiche wie bei Glaeßner: 10 ccm Saft wurden durch 0,8 ccm $\frac{n}{20}$ -Schwefelsäure neutralisiert bei Anwendung von Phenolphthalein als Indikator (Glaeßner: 1 ccm), aber auch in den Stunden nach der Nahrungsaufnahme ging die Alkaleszenz nur bis zum Verbrauch von 1 ccm $\frac{n}{20}$ -Schwefelsäure in die Höhe, während sie bei Glaeßner bis aufs Fünffache des Nüchternwertes stieg. Ein höherer Verbrauch als 1,6 ccm $\frac{n}{20}$ -Schwefelsäure wurde in keinem Falle beobachtet. Bei Anwendung von Methylorange als Indikator stellten sich die Alkaleszenzwerte sehr ähnlich denjenigen von Schumm.

Wir lassen nunmehr in tabellarischer Übersicht die Beobachtungen folgen, welche an dem Patienten nach Verabreichung verschiedener Kost erhoben wurden. Das Verhalten der Fistel war leider unsern Bemühungen insofern ungünstig, als am 6. Juli ziemlich unvermittelt die Sekretion versiegte, und vom 9. Juli an, als sie wieder eingesetzt hatte, weit unregelmäßiger

¹⁾ l. c. S. 20 u. 21.

und im ganzen geringer wurde als vorher. Dadurch wurde die Ausführung unseres Versuchsplans, möglichst vergleichbare Werte der Sekretionsgröße und des Fermentgehalts bei gemischter Kost sowie bei vorwiegender Fleisch-, Fett- oder Stärkediat zu erhalten, stark beeinträchtigt. Vergleichbar sind höchstens die Resultate der beiden ersten und der beiden letzten Versuche unter sich. Wir sahen davon ab, wie Walter in seinen Hunderversuchen, das Regime so zu wählen, daß stets die gleiche Stickstoffmenge einverleibt wurde, weil wir glaubten, daß bei unsrer Versuchsanordnung die von Pawlow angenommene Zweckmäßigkeit der Fermentproduktion deutlicher zum Ausdruck kommen mußte.

Tabelle III.

Versuch I. (Gemischte Kost: 100 g Beefsteak, 300 g Milch, 4 Zwieback.)

Zeit	Stündliche Saft- menge in ccm	Proteolytisches Ferment		Diastatisches Ferment		Fettspaltendes Ferment	
		Verdaute Eiweiß- säule in mm	Fer- ment- menge ¹⁾	Verdaute Stärke- säule in mm	Fer- ment- menge	Anz. ccm n/10-KOH	Fer- ment- menge
28. Juni 6—8 ²⁵	6,4 Nüchtern	2,25	32,4	2,0	25,6	19,0	2310
8 ²⁵ — 9 ²⁵ 9 ²⁵ —10 ²⁵	14,0 ²⁾ 21,5	4,8	817,9	1,8	115,0	17,8	11242
10 ²⁵ —11 ²⁵	28,5	5,3	800,8	1,8	92,3	21,7	13421
11 ²⁵ —12 ²⁵ 12 ²⁵ — 1 ²⁵	14,0 6,4	5,8	686,3	1,9	73,6	22,5	10327
Summe für 5 Stunden	84,4	—	2305,0	—	280,9	—	34990

¹⁾ Die Fermentmenge ist nach Pawlows Vorgang berechnet als Produkt von Saftmenge \times Quadrat der Millimeter Eiweiß- oder Stärkesäule bezw. \times Quadrat der Kubikzentimeter verbrauchter Kalilauge.

²⁾ Aus äußeren Gründen mußten öfters bei einem Versuch die Saftmengen von 2 Stunden zur Untersuchung auf Fermente vereinigt werden.

Tabelle IV.

Versuch II. (Fettkost: $\frac{1}{3}$ l Sahne und ca. 50 g Butter.)

Zeit	Stündliche Saftmenge in ccm	Proteolytisches Ferment		Diastatisches Ferment		Fettspaltendes Ferment	
		Verdaute Eiweißsäule in mm	Ferment- menge	Verdaute Stärke- säule in mm	Ferment- menge	Verbrauchte n/100-KOH in ccm	Ferment- menge
30. Juni 6—830	7,3 (Nüchtern)	3,4	84,7	2,0	29,2	16,6	2011
830—990	11,0	2,6	161,5	1,85	81,7	11,1	2944
990—1030	12,9						
1030—1130	18,0	2,8	142,1	1,5	40,5	10,6	2022
1130—1230	9,0	2,7	122,5	1,8	54,4	12,3	2541
1230—130	7,8						
In 5 Stunden	58,7	—	426,1	—	176,6	—	7507

Tabelle V.

Versuch III. (Fleischkost: 250 g [roh gewogen] Beefsteak.)

Zeit	Stündliche Saftmenge in ccm	Proteolytisches Ferment		Diastatisches Ferment		Fettspaltendes Ferment	
		Verdaute Eiweißsäule in mm	Ferment- menge	Verdaute Stärke- säule in mm	Ferment- menge	Verbrauchte n/100-KOH in ccm	Ferment- menge
14. Juli 1240—140	6,0 <small>Vor dem Essen</small>	0,5	1,5	1,8	19,4	0,8 (?)	38
140—240	3,0	4,3	360,5	1,6	49,9	11,8	2714
240—340	16,5						
340—440	8,5	4,4	164,6	1,1	10,3	5,7	276
440—540	15,5	3,8	223,8	1,5	34,9	7,2	803
540—640	9,0	2,5	56,3	1,5	20,3	7,9	562
In 5 Stunden	52,5	—	805,2	—	115,4	—	4355

Tabelle VI.

Versuch IV. (Stärkecost: Grütze aus 40—50 g Hafermehl.)

Zeit	Stündliche Saft- menge in ccm	Proteolytisches Ferment		Diastatisches Ferment		Fettspaltendes Ferment	
		Verdaute Eiweiß- säule in mm	Fer- ment- menge	Verdaute Stärke- säule in mm	Fer- ment- menge	Ver- brauchte n/100-KOH in ccm	Fer- ment- menge
16. Juli ¹⁾							
880—980	1,6	4,0	25,6	2,1	7,1	8,0	102,4
980—1080	6,5	4,3	120,2	1,5	14,6	8,4	458,6
1080—1180	4,0	3,4	46,2	1,5	9,0	8,4	282,2
1180—1280	3,0	3,5	36,8	1,9	10,8	16,4 ²⁾ (?)	846,7
In 4 Stunden	15,1	—	228,8	—	41,5	—	1689,9
Für 5 Stunden berechnet	19,0	—	286,0	—	52,0	—	2112,5

In der folgenden Tabelle sind die Resultate sämtlicher Versuche zu einer Übersicht vereinigt, wie sie sich auch in der Arbeit von Walter für dessen Versuche findet. Für jedes Ferment ist in der rechten Spalte die während 5 Stunden insgesamt abgesonderte Fermentmenge, in der linken Spalte der berechnete Durchschnittswert für die verdauten Eiweiß- und Stärkesäulen bzw. für die verbrauchte Kalilauge angegeben.

Tabelle VII.

Übersicht der vier Versuche.

Diät	Saft- menge	Proteolytisches Ferment		Diastatisches Ferment		Lipolytisches Ferment	
		Durch- schnitt	Ges.- Menge	Durch- schnitt	Ges.- Menge	Durch- schnitt	Ges.- Menge
Gemischte Kost .	84,4	5,23	2305,5	1,83	280,9	20,36	34990
Fettkost	58,7	2,69	426,1	1,73	176,6	11,31	7507
Fleischkost . . .	52,5	3,92	805,2	1,48	115,4	9,11	4355
Stärke	19,0	3,88	286,0	1,66	52,0	10,54	2112,5

¹⁾ Beobachtungen an dem im nüchternen Zustand vor dem Genuß der Grütze entleerten Saft mußten leider unterbleiben, weil die Sekretion vorher fast stockte.

²⁾ Dieser so sehr abweichende Wert wurde durch Kontrollbestimmungen sicher gestellt.

Zum Vergleiche fügen wir eine entsprechende Übersicht über drei Versuche von Walter bei.

Tabelle VIII.

Übersicht über drei Versuche von Walter am Hunde.

Diät	Saftmenge	Proteolytisches Ferment		Diastatisches Ferment		Lipolytisches Ferment	
		Durchschnitt	Ges.-Menge	Durchschnitt	Ges.-Menge	Durchschnitt	Ges.-Menge
600 ccm Milch	46 ccm in 4 St.	4,75	1038	6,12	1722	9,3	3979
250 g Brot	151 > > 8 >	3,62	1971	6,5	6380	2,3	799
100 g Fleisch	144 > > 4 >	3,25	1520	4,24	2589	5,0	3600

Was zunächst die Sekretionsgröße angeht, so fällt auf, daß bei unserm Patienten die Saftmenge nach Stärkenahrung besonders gering war, während sie beim Hunde gerade nach Brotfütterung den höchsten Wert erreichte; ferner, daß nach gemischter Kost weitaus die größte Absonderung stattfand. Übrigens wird man bei Vergleichen der Resultate am Menschen und am Hunde stets zu beachten haben, daß außerhalb der Versuchszeit auch beim Menschen eine recht erhebliche Sekretion stattfindet, beim Hunde dagegen fast nichts abgesondert wird.

Für die Frage der Zweckmäßigkeit Schlüsse aus unsern Beobachtungen zu ziehen, halten wir für verfrüht. Die Mengen des abgesonderten lipolytischen und proteolytischen Ferments scheinen dafür, die des diastatischen Ferments dagegen zu sprechen — vorausgesetzt, daß man überhaupt die Versuche 2—4 in Vergleich setzen darf. Die Untersuchung künftiger Fälle müßte vor allen Dingen festzustellen suchen, ob überhaupt eine Gesetzmäßigkeit hier vorliegt, ob auf die gleiche Diät stets mit der Absonderung eines qualitativ und quantitativ gleichen oder ähnlichen Safts reagiert wird. Weiterhin wäre der Einfluß der Magenverdauung auf die Pankreassekretion, namentlich die Wirkung des Eintritts von Salzsäure in den Dünndarm, worüber ein orientierender Versuch von Glaeßner schon vorliegt, genauer zu analysieren. Die eigenartigen Verhältnisse unseres Falls verhinderten uns leider, derartige Versuche, welche auf unserm Programm standen, auszuführen.

Über die aus den Keimpflanzen von *Vicia sativa* und *Lupinus albus* darstellbaren Monoaminosäuren.

Von

E. Schulze und E. Winterstein.

(Aus dem agrikultur-chemischen Laboratorium des Polytechnikums in Zürich.)
(Der Redaktion zugegangen am 28. April 1905.)

Zur Trennung der von E. Schulze und seinen Mitarbeitern aus Keimpflanzen dargestellten vier Monoaminosäuren, nämlich der Aminovaleriansäure, des Leucins, des Phenylalanins und des Tyrosins, haben unvollkommene Methoden gedient. Das bei Verarbeitung der Pflänzchen erhaltene rohe Aminosäurengemenge wurde zunächst aus einem heißen Gemisch von Alkohol und konzentrierter Ammoniakflüssigkeit umkristallisiert, wobei das etwa vorhandene Tyrosin wegen seiner Schwerlöslichkeit in jenem Gemisch größtenteils zurückblieb. Das umkristallisierte Produkt wurde in heißem Wasser gelöst, die Lösung mit Kupferhydroxyd versetzt; bestand nun jenes Produkt im wesentlichen aus Phenylalanin und Aminovaleriansäure, wie dies in mehreren Fällen zutraf, so schied sich nahezu reines Phenylalaninkupfer aus, während Aminovaleriansäure mit einem Teil des Phenylalanins als Kupferverbindung in der tiefblauen Mutterlauge gelöst blieb. Die erstere Aminosäure ließ sich rein erhalten, indem man die vom Kupfer befreite Mutterlauge eindunstete und das dabei erhaltene Produkt wiederholt umkristallisierte. Schwieriger war die Trennung, wenn neben Phenylalanin und Aminovaleriansäure Leucin in größerer Menge sich vorfand, da letzteres teils mit dem Phenylalanin sich als Kupferverbindung ausschied, teils mit der Aminovaleriansäure in Lösung blieb. Wie wir in solchem Falle verfahren, um die genannten Aminosäuren neben einander nachzuweisen, ist in den früher publizierten Abhandlungen beschrieben worden;

hier sei nur noch erwähnt, daß wir zur Isolierung des Phenylalanins auch die Fällbarkeit dieser Aminosäure durch Phosphorwolframsäure benutzt haben.

Nachdem Emil Fischer¹⁾ sein Verfahren zur Trennung der Aminosäuren beschrieben hatte, war es geboten, dasselbe auch auf die aus den Keimpflanzen darstellbaren Stoffe solcher Art anzuwenden; man durfte hoffen, auf diesem Wege neben den bisher aus Pflanzen isolierten Aminosäuren noch einige andere Glieder dieser Stoffgruppe nachweisen zu können. Wir haben jenes Verfahren auf die Aminosäuren angewendet, die sich aus den Keimpflanzen von *Vicia sativa* und *Lupinus albus* gewinnen lassen.

Bei Untersuchung dieser Keimpflanzen stellten wir uns noch zwei andere Aufgaben. Erstens prüften wir, ob in den Pflänzchen auch das von F. Ehrlich²⁾ entdeckte Isoleucin, dessen Trennung vom Leucin auf der Löslichkeit seiner Kupferverbindung in Methylalkohol beruht, sich vorfindet; zweitens untersuchten wir die Pflänzchen auf das Vorhandensein von Tryptophan. Bekanntlich ist der Nachweis und die Isolierung dieses Körpers durch die von Hopkins und Cole³⁾ angegebenen Verfahren ermöglicht worden.

Ehe wir zur Trennung des Isoleucinkupfers vom Leucinkupfer den Methylalkohol verwendeten, prüften wir noch das Verhalten des letzteren gegen die Kupferverbindungen einiger anderen Aminosäuren. Es zeigte sich, daß die Kupfersalze des Glykokolls, des Alanins,⁴⁾ des Leucins, des Phenylalanins und des Tyrosins sich in kaltem Methylalkohol entweder gar nicht, oder doch nur in äußerst geringer Menge lösten. Anders verhielt sich das aminovaleriansaure Kupfer, dargestellt aus einem aus Keimpflanzen gewonnenen Aminovaleriansäurepräparat. Beim Übergießen dieses Salzes mit Methylalkohol entstand rasch eine blaugefärbte Lösung. Um den Löslichkeitsgrad des Salzes

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 150 u. 412; Bd. XXXV, S. 70.

²⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVII, S. 1809.

³⁾ Journal of Physiol. (1902), Bd. XXVII, S. 418.

⁴⁾ Zur Verwendung kam ein aus racemischem Alanin dargestelltes Kupfersalz.

zu bestimmen, ließen wir ca. 1 g desselben mit einer zur völligen Auflösung nicht hinreichenden Quantität von entwässertem Methylalkohol unter wiederholtem Umschütteln längere Zeit in Berührung; von der vom Ungelösten abfiltrierten Flüssigkeit wurde sodann ein abgewogenes Quantum eingedunstet, das dabei zurückbleibende Salz getrocknet und gewogen. Wir erhielten so folgende Zahlen:

1. 11,1236 g Lösung gaben beim Eindunsten 0,2116 g Rückstand; 0,2116 g des Kupfersalzes hatten sich also in 10,9120 g Methylalkohol gelöst. Daraus ergibt sich eine Löslichkeit von 1:52,0 bei 18° C.

2. 19,6716 g Lösung gaben beim Eindunsten 0,3726 g Rückstand; 0,3726 g des Kupfersalzes hatten sich also in 19,2990 g Methylalkohol gelöst. Daraus ergibt sich eine Löslichkeit von 1:51,8 bei 18° C.

Für eine dritte Bestimmung verwendeten wir nicht wasserfreien Methylalkohol, sondern ein direkt dem Handel entnommenes Produkt. Die Bestimmung gab folgendes Resultat:

20,0804 g Lösung gaben 0,3750 g Rückstand; 0,3750 g des Kupfersalzes hatten sich also in 19,7054 g Methylalkohol gelöst. Daraus ergibt sich eine Löslichkeit von 1:52,6 bei 18° C.

Nach den Versuchen von F. Ehrlich löst sich ein Teil Isoleucinkupfer in 55 Teilen Methylalkohol bei 17° C.; das aminovaleriansaure Kupfer zeigt also ungefähr die gleiche Löslichkeit in diesem Alkohol, wie das Isoleucinkupfer. Eine Trennung dieser beiden Kupfersalze mit Hilfe von Methylalkohol läßt sich also nicht ausführen; dagegen kann man dieses Lösungsmittel zur Trennung der Aminovaleriansäure vom Leucin und von anderen Aminosäuren, deren Kupfersalze darin unlöslich sind, benutzen. Festzustellen wird noch sein, ob etwa unter den Eiweißzersetzungsprodukten auch eine Aminovaleriansäure sich findet, deren Kupfersalz in Methylalkohol unlöslich ist; einige in unserem Laboratorium gemachte Beobachtungen scheinen dies anzudeuten.

Da nach den von verschiedener Seite gemachten Angaben der Löslichkeitsgrad des Leucinkupfers, sowie anderer schwerlöslicher Kupferverbindungen von Aminosäuren in Wasser durch das gleichzeitige Vorhandensein anderer leicht löslicher Kupfer-

verbindungen solcher Art stark beeinflußt wird, so kann man fragen, ob etwas Ähnliches für die Löslichkeit der Kupferverbindungen in Methylalkohol gilt. Es wäre ja z. B. denkbar, daß in einer Lösung von aminovaleriansaurem Kupfer in Methylalkohol Leucinkupfer sich in gewissem Grade auflöst, während es in reinem Methylalkohol unlöslich ist. Doch liegt kein Grund für eine solche Annahme vor. Wie aus den weiter unten gemachten Mitteilungen sich ersehen läßt, haben wir reine Aminovaleriansäure aus einem Kupfersalz erhalten, das wir durch Auflösung in Methylalkohol vom Leucinkupfer trennten. Zu diesem Resultat hätten wir aber nicht gelangen können, wenn das Leucinkupfer sich in einer methylalkoholischen Lösung von aminovaleriansaurem Kupfer partiell gelöst hätte. Auch die von F. Ehrlich in bezug auf das Isoleucin erhaltenen Ergebnisse stehen jener Annahme entgegen.

Die von uns untersuchten Keimpflanzen waren teils bei Lichtabschluß, teils bei schwachem Lichtzutritt¹⁾ in Sand gezogen worden; sie kamen teils nach 8—9tägiger, teils nach 18—20tägiger Vegetationsdauer zur Verwendung. Warum wir Pflänzchen von ungleichem Alter für die Untersuchung verwendeten, ist noch mit einigen Worten zu erklären. Aus den in unserem Laboratorium ausgeführten Untersuchungen ist zu schließen, daß die primären Eiweißzersetzungsprodukte im Stoffwechsel der Keimpflanzen teils schneller, teils weniger schnell eine Umwandlung erfahren. Somit ist die Wahrscheinlichkeit, bei Untersuchung der Pflänzchen alle beim Eiweißzerfall entstandenen Produkte neben einander vorzufinden, dann am größten, wenn die Pflänzchen in einem Vegetationsstadium untersucht werden, in welchem in ihnen noch starker Eiweißzerfall stattfindet. In einem späteren Vegetationsstadium können dagegen manche der primären Eiweißzersetzungsprodukte infolge der inzwischen erfolgten Umwandlung fehlen oder doch nur in sehr kleiner Menge sich vorfinden. Andererseits können

¹⁾ Wenn die Keimpflanzen schon nach kurzer Dauer ihrer Vegetation, z. B. nach 8—9 Tagen, geerntet werden, so kommt nichts darauf an, ob während ihrer Entwicklung das Licht vollständig oder weniger vollständig abgehalten wird.

Keimpflanzen von höherem Alter sehr geeignete Objekte zur Darstellung derjenigen Eiweißzersetzungsprodukte sein, welche der schnellen Umwandlung im Stoffwechsel entgangen sind und sich demnach in den Pflänzchen angehäuft haben. Es war für uns also das richtigste, Keimpflanzen von ungleichem Alter für unsere Versuche zu verwenden.

a) 8—9tägige Keimpflanzen von *Vicia sativa*.

Die Keimpflanzen von *Vicia sativa* sind in unserem Laboratorium schon mehrmals untersucht worden.¹⁾ In 6—7tägigen Pflänzchen solcher Art fand man neben einer geringen Tyrosinmenge Leucin, ferner auch Arginin, Lysin und Histidin. In mehrwöchentlichen etiolierten Pflänzchen wurden Leucin, Aminovaleriansäure und Phenylalanin, ferner auch Cholin, Betain und Guanidin nachgewiesen. Es war nun zu prüfen, ob neben den früher schon isolierten Monoaminosäuren mit Hilfe der in der Einleitung genannten Methoden noch andere aus solchen Keimpflanzen sich darstellen ließen.

Die getrockneten und zerriebenen Pflänzchen²⁾ wurden zuerst mit 92%igem, dann mit 90%igem Weingeist ausgekocht, die vereinigten Extrakte der Destillation unterworfen. Den Destillationsrückstand nahmen wir in Wasser auf, versetzten die trübe Flüssigkeit mit Tannin, beseitigten den dadurch erzeugten Niederschlag durch Filtration, fügten dem Filtrate Bleiessig in schwachem Überschuß zu, filtrierten wieder, befreiten das Filtrat mittels Schwefelwasserstoff vom Blei und engten es hierauf in flachen Porzellanschalen im Wasserbade ein, bis auf der Oberfläche der Flüssigkeit ein Häutchen sich bildete; dann ließ man erkalten. Es bildete sich nun eine größtenteils aus Aminosäuren bestehende Ausscheidung. Sie wurde nach Verlauf von einigen Tagen mit Hilfe einer Nutsche von der sirupösen Mutterlauge getrennt, nachdem letztere mit etwas Alkohol vermischt worden war. Die auf der Nutsche ver-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XVII, S. 193, und Bd. XXX, S. 341.

²⁾ Die von uns in der oben beschriebenen Weise verarbeiteten Keimpflanzen waren unter Aufwendung von ca. 20 kg Wickensamen dargestellt worden.

bliebene Masse wurde mit etwas Weingeist gewaschen, dann zur Entfernung des Restes der Mutterlauge auf Tonplatten gestrichen. Sie bildete nun eine nicht stark gefärbte, zerreibliche Masse, die das Aussehen des unreinen Leucins besaß. Diese Masse wurde zerrieben und sodann mit absolutem Alkohol ausgekocht. Die dabei entstandene Lösung fügten wir der sirupösen Mutterlauge zu. Das Gewicht des beim Auskochen mit Alkohol verbliebenen Rückstandes betrug nach dem Trocknen etwas mehr als 50 g. Da aus den bei Untersuchung der Wickenkeimpflanzen früher gemachten Beobachtungen geschlossen werden durfte, daß dieser Rückstand in der Hauptsache aus Leucin bestand, so haben wir denselben nicht für die Veresterung verwendet (wir benutzten dazu, wie aus dem weiter unten Mitgeteilten zu ersehen ist, nur die von diesem Produkt abgeflossene Mutterlauge); dagegen untersuchten wir diesen Rückstand auf Isoleucin. Zu diesem Zweck wurde derselbe zunächst zweimal aus einem heißen Gemisch von Alkohol und konzentrierter Ammoniakflüssigkeit umkristallisiert. Das so erhaltene, fast farblose Produkt lösten wir in heißem Wasser und fügten der Lösung Kupferhydroxyd in schwachem Überschuß zu. Schon in der Wärme schied sich eine Kupferverbindung aus; sie wurde abfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen und getrocknet. Die davon abfiltrierte tiefblaue Flüssigkeit wurde eingedunstet, der Verdampfungsrückstand getrocknet. Die so erhaltenen Kupfersalze behandelten wir nun bei Zimmertemperatur mit Methylalkohol. Es zeigte sich, daß von dem beim Eindunsten der Mutterlauge erhaltenen Kupfersalz sich ein ansehnlicher Teil, von dem anderen dagegen nur wenig in Methylalkohol löste. Die vereinigten methylalkoholischen Extrakte wurden der Destillation unterworfen, der dabei verbliebene Rückstand in Wasser aufgenommen und durch Schwefelwasserstoff zersetzt, die im Filtrat vom Schwefelkupfer erhaltene Aminosäure sodann zur Kristallisation gebracht und hierauf noch einmal aus Wasser, unter Zusatz von etwas Weingeist, umkristallisiert. Das in dieser Weise erhaltene Produkt glich im Aussehen dem Leucin; es verflüchtigte sich beim Erhitzen im Röhrchen unter Bildung eines weißen Sublimates, war

schwer löslich in kaltem Wasser, unlöslich in absolutem Alkohol. Die Analyse gab folgende Resultate:

1. 0,2145 g Substanz gaben 21,2 ccm Stickstoffgas bei 722 mm Druck und 14° C. = 0,023677 g N;
2. 0,1100 g Substanz gaben 11,1 ccm Gas bei 720 mm Druck und 15° C. = 0,0122448 g N.

Berechnet	Gefunden:	
für $C_9H_{13}NO_3$:	1.	2.
N = 10,70%	11,03%	11,13%

Der gefundene Stickstoffgehalt übersteigt, wie man sieht, ein wenig denjenigen des Leucins; in Anbetracht des Umstandes, daß die volumetrische Stickstoffbestimmung in der Regel ein wenig zu hohe Zahlen liefert, kann die Differenz wohl als unbedeutend bezeichnet werden. Wahrscheinlich ist, daß ein Isoleucinpräparat vorlag, welchem noch ein wenig Aminovaleriansäure beigemischt war.

Wir bestimmten nun das spezifische Drehungsvermögen der wässrigen Lösung dieses Präparates. Dabei ergab sich folgendes Resultat:

Eine wässrige Lösung, die in 20 ccm 0,50 g Substanz enthielt, drehte im 200 mm-Rohr bei 16° C. 1,4° S. V. nach rechts; demnach ist $(\alpha) D^{16} = + 9,6^\circ$.

F. Ehrlich (loc. cit.) fand für Isoleucin in wässriger Lösung $(\alpha) D^{20} = + 9,74^\circ$. Da die von uns verwendete Lösung nur eine geringe Konzentration besaß, so muß es als möglich bezeichnet werden, daß der von uns ausgeführten Bestimmung kein hoher Grad von Genauigkeit zukommt. Wir bestimmten daher auch noch das spezifische Drehungsvermögen, welches die von uns dargestellte Aminosäure in salzsaurer Lösung besaß:

Eine Lösung in 20%iger Salzsäure, welche in 10 ccm 1 g Substanz enthielt, drehte im 200 mm-Rohr bei 16° C. 20,5° S. V. nach rechts; demnach ist $(\alpha) D^{16} = + 35,2^\circ$.

F. Ehrlich fand für Isoleucin in 20%iger Salzsäure $(\alpha) D^{20} = + 36,8^\circ$. Daß wir für unser Präparat ein etwas schwächeres Drehungsvermögen fanden, wird wahrscheinlich seinen Grund darin haben, daß dieses Präparat noch eine kleine Quantität von Aminovaleriansäure einschloß.¹⁾

¹⁾ Für Aminovaleriansäure wurde $(\alpha) D^{16} = + 27,9^\circ$ gefunden.

Wenn man neben den im vorigen mitgeteilten Versuchsergebnissen auch noch den Umstand berücksichtigt, daß das Kupfersalz unserer Aminosäure in Methylalkohol löslich war, so kann man nicht daran zweifeln, daß Isoleucin vorlag, allerdings wohl noch verunreinigt durch ein wenig Aminovaleriansäure. Wir erinnern hier auch noch daran, daß wir früher schon aus den Keimpflanzen von *Vicia sativa* eine im Stickstoffgehalt mit Leucin übereinstimmende Substanz erhielten,¹⁾ deren spezifisches Drehungsvermögen zwischen demjenigen des Leucins und des Isoleucins lag; daß diese Substanz ein Gemenge dieser beiden Aminosäuren war, muß jetzt für sehr wahrscheinlich erklärt werden.

Wie aus den oben gemachten Angaben zu ersehen ist, erhielten wir das Isoleucin aus dem in Methylalkohol löslichen Anteil der Kupfersalze, über deren Darstellung oben berichtet wurde. Der in dem genannten Lösungsmittel unlösliche Teil der Kupfersalze lieferte bei der Zerlegung mittels Schwefelwasserstoff eine im Aussehen und im Verhalten dem Leucin gleichende Aminosäure. Für reines Leucin ist es charakteristisch, daß seine heiße wässrige Lösung auf Zusatz von Kupferacetat sofort oder nach kurzer Zeit eine aus feinen Kristallblättchen bestehende Kupferverbindung fallen läßt. Das von uns in der beschriebenen Weise erhaltene Leucin lieferte eine solche Kupferverbindung in reichlicher Menge. Die daraus wieder abgetrennte Aminosäure wurde zur Kristallisation gebracht und sodann im Soleil-Ventzkeschen Polarisationsapparat untersucht. Dabei ergab sich folgendes Resultat:

Eine Lösung in 20% iger Salzsäure, die in 10 ccm 0,50 g Substanz enthält, drehte im 200 mm-Rohr bei 16 ° C. 5 ° nach rechts; demnach ist $(\alpha) D = + 17,2^\circ$.

Dieses Resultat stimmt mit der für ein Leucinpräparat aus Conglutin gefundenen Zahl $[(\alpha) D = + 17,3^\circ]$ sehr gut überein. Eine etwas höhere Zahl, nämlich $(\alpha) D = + 17,8^\circ$, haben wir früher unter gleichen Bedingungen für ein aus Wickenkeimpflanzen dargestelltes Leucinpräparat gefunden.²⁾ Möglich ist, daß das letztere noch ein wenig Isoleucin eingeschlossen hat.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXV, S. 306.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXV, S. 305.

Die aus unserem Leucinpräparat dargestellte Kupferverbindung gab bei der Analyse folgendes Resultat:¹⁾

0,2150 g Substanz gaben 0,0525 g CuO = 19,50% Cu.

Die Theorie verlangt für Leucinkupfer einen Gehalt von 19,55% Cu.

Ohne Zweifel war Leucin diejenige Aminosäure, die in dem früher beschriebenen Rohprodukt (Gewicht ca. 50 g) in größter Menge enthalten war. Das neben Leucin erhaltene Isoleucinpräparat wog nur ca. 2 g.

Die von jenem Rohprodukt abfiltrierte dickflüssige Mutterlauge lieferte bei weiterem Verdunsten noch eine Ausscheidung, die sich jedoch von dem Sirup nicht gut trennen ließ. Wir wendeten nun auf diese Mutterlauge das Esterverfahren E. Fischers an, in der Hoffnung, daß es möglich sein werde, die Aminosäurenester durch Extraktion mit Äther von den übrigen Bestandteilen der Mutterlauge (Kohlenhydrate, Basen etc.) zu trennen. Diese Hoffnung ging in der Tat in Erfüllung. Was die Ausführung der Operationen betrifft, so braucht nur gesagt zu werden, daß dreimal unter Zusatz von je 1 l Alkohol verestert wurde. Die Abscheidung der Ester mittels Äther, Lauge und Pottasche war wegen des gleichzeitigen Vorhandenseins von Kohlenhydraten und von den bei Einwirkung der Salzsäure auf letztere entstandenen humosen Produkten infolge Bildung einer Emulsion nicht ganz leicht; indessen gelang es doch, eine beträchtliche Quantität von Estern zu isolieren. Bei der fraktionierten Destillation der letzteren im Vacuum zeigte sich, daß bei einer unter 80° liegenden Temperatur noch keine Ester übergingen; über den Siedepunkt und über die Quantität der bei der Destillation erhaltenen Fraktionen gibt die nachfolgende Tabelle Aufschluß:

	Druck	Temperatur	Gewicht
I.	10	80°	4
II.	10	100°	18,2
III.	10	120°	4,5
IV.	10	120—140°	3,4

¹⁾ Bei Ausführung der Kupferbestimmungen wurden die zuvor bei 100—105° getrockneten Kupfersalze durch Erhitzen über einer kleinen Flamme langsam zersetzt. Den dabei im Tiegel verbliebenen Rückstand glühten wir dann stark bis zur völligen Konstanz des Gewichtes.

Die Fraktionen I bis III wurden durch Kochen mit Wasser verseift, die dabei entstandenen Aminosäuren zur Trockne gebracht und sodann mit Alkohol extrahiert. Das Extrakt untersuchten wir auf α -Pyrrolidinkarbonsäure. Letztere schien in sehr kleiner Menge vorhanden zu sein, konnte aber nicht sicher nachgewiesen werden.

Über die Art und Weise, in der wir die aus den Fraktionen I bis III erhaltenen Aminosäuren weiter behandelten, und über die dabei erhaltenen Resultate ist folgendes anzugeben: Die Aminosäuren der Fraktion I wurden in die Kupfersalze übergeführt, letztere sodann bei Zimmertemperatur mit Methylalkohol behandelt. Der größte Teil der Kupfersalze ging in Lösung, nur ein kleiner Teil blieb ungelöst zurück. Der letztere lieferte bei der Zerlegung eine Aminosäure, die im Aussehen dem Leucin glich und sowohl beim Erhitzen im Glasröhrchen als auch beim Versetzen ihrer heißen wässerigen Lösung mit Kupferacetat sich wie Leucin verhielt. Ihre Quantität war sehr gering; eine Analyse wurde nicht ausgeführt. Der in die methylalkoholische Lösung übergegangene Teil der Kupfersalze wurde nach dem Abdestillieren des Methylalkohols in Wasser gelöst, die Lösung zur Kristallisation eingedunstet. Das dabei erhaltene, aus blättrigen Kristallen bestehende Kupfersalz gab bei der Analyse folgendes Resultat:

0,1970 g Substanz gaben 0,0516 g CuO = 20,86% Cu.

Diese Zahl liegt zwischen dem Kupfergehalt des aminovaleriansauren Kupfers (21,47% Cu) und demjenigen des Isoleucinkupfers (19,55% Cu). Es ist demnach das wahrscheinlichste, daß der in Methylalkohol lösliche Teil der Kupfersalze aus einem Gemenge von aminovaleriansaurem Kupfer und Isoleucinkupfer bestand; doch war wohl das erstere Salz in größerer Quantität vorhanden, als das letztere.

Die Aminosäuren der Fraktion II wurden gleichfalls in die Kupfersalze übergeführt. Der größte Teil dieser Kupfersalze war löslich in Methylalkohol. Die methylalkoholische Lösung wurde der Destillation unterworfen. Nachdem etwa die Hälfte des Lösungsmittels abdestilliert worden war, ließ man die rückständige Flüssigkeit erkalten. Sie lieferte eine starke Aus-

scheidung von dunkelblauen Kristallen. Nachdem die Mutterlauge abgegossen worden war, wurden diese Kristalle mehrmals mit kaltem Methylalkohol gewaschen, dann in kaltem Wasser gelöst. Die von einem kleinen Rückstand abfiltrierte Lösung lieferte beim Verdunsten blättrige Kristalle, bei deren Analyse folgendes Resultat erhalten wurde:

0,2555 g Substanz gaben 0,0678 g CuO = 21,04% Cu.

Diese Zahl liegt nicht viel unter dem von der Formel des aminovaleriansauren Kupfers geforderten Werte.

Die bei der Zerlegung dieser Kupferverbindung erhaltene Aminosäure wurde aus Wasser umkristallisiert und sodann analysiert:

0,2246 g Substanz gaben 24,0 ccm Stickstoffgas
bei 16° C. und 716 mm Druck = 0,02628 g oder 11,70% N.

Der Stickstoffgehalt dieses Präparates lag also nicht viel unter demjenigen der Aminovaleriansäure. Unter gleichzeitiger Berücksichtigung des bei Analyse des Kupfersalzes erhaltenen Resultates kann es für sehr wahrscheinlich erklärt werden, daß ein Gemenge von Aminovaleriansäure mit wenig Isoleucin vorlag.

Die von dem für diese Versuche benutzten Kupfersalz abgegossene tiefblaue Mutterlauge lieferte beim Verdunsten ein Produkt, welches offenbar gleichfalls ein Gemenge mehrerer Kupfersalze war. Das aus Wasser umkristallisierte Produkt lieferte bei der Analyse folgendes Resultat:

0,1914 g Substanz gaben 0,0494 g CuO = 20,62% Cu.

Auch diese Zahl liegt zwischen den Werten, die den Formeln des aminovaleriansauren Kupfers und des Isoleucinkupfers entsprechen.

Der in Methylalkohol unlösliche Teil der Kupfersalze der Aminosäuren von Fraktion II gab bei der Zerlegung mittels Schwefelwasserstoff eine im Aussehen und im Verhalten mit Leucin übereinstimmende Aminosäure. Ihre wässrige Lösung gab auf Zusatz von Kupferacetat eine dem Leucinkupfer gleichende Ausscheidung. Die Analyse dieses Produktes gab folgendes Resultat:

0,3724 g Substanz gaben 0,0914 g CuO = 19,61% Cu.

Die Theorie verlangt für Leucinkupfer einen Gehalt von 19,55% Cu.

Die aus Fraktion III erhaltenen Aminosäuren, deren Gewicht nur 1,2 g betrug, lieferten gleichfalls Kupfersalze, von denen

ein Teil in Methylalkohol löslich, ein Teil darin unlöslich war. Die methylalkoholische Lösung wurde eingedunstet, der Verdampfungsrückstand in Wasser gelöst, die Lösung sodann zur Kristallisation gebracht. Das in dieser Weise erhaltene, im Aussehen vom aminovaleriansauren Kupfer verschiedene Kupfersalz gab bei der Analyse folgendes Resultat:

0,220 g Substanz gaben 0,0538 g CuO = 19,50% Cu.

Das Salz stimmte also im Kupfergehalt mit Isoleucinkupfer überein. Die Quantität, in der wir dasselbe erhielten, war so gering, daß wir damit weitere Versuche nicht anstellen konnten. Der in Methylalkohol unlösliche Teil der Kupfersalze lieferte bei der Zerlegung eine im Aussehen und Verhalten dem Leucin gleichende Aminosäure.

Keine der drei Fraktionen hat somit bei der Verseifung ein einheitliches Produkt geliefert, stets wurden Gemenge mehrerer Aminosäuren erhalten. Man darf auf Grund der im vorigen gemachten Beobachtungen annehmen, daß Gemenge von Leucin, Isoleucin und Aminovaleriansäure vorlagen. Es sei schon hier erwähnt, daß das Gleiche auch für die Fraktionen gilt, die bei der Untersuchung der aus den Keimpflanzen von *Lupinus albus* dargestellten Aminosäuren in entsprechender Weise erhalten wurden (man vergleiche die weiter unten folgenden Angaben).

Aus Fraktion IV, deren Gewicht nur 3,4 g betrug, wurde Phenylalanin erhalten, gemengt mit einer anderen Substanz, die sich jedoch durch Extraktion mit Alkohol entfernen ließ. Das in dieser Weise gereinigte Phenylalanin wurde mit Hilfe seiner Reaktionen identifiziert; seine Quantität war sehr gering.

Aus den 8—9 tägigen Keimpflanzen von *Vicia sativa* konnte also außer den früher schon darin nachgewiesenen Monoaminosäuren, nämlich Leucin, Aminovaleriansäure und Phenylalanin, auf dem von uns eingeschlagenen Wege nur noch Isoleucin erhalten werden. Unter den aus diesem Material dargestellten Aminosäuren prävalierte der Menge nach das Leucin. Aminovaleriansäure schien in größerer Menge vorhanden zu sein, als Isoleucin. Phenylalanin wurde, wie oben schon erwähnt ist, nur in sehr kleiner Quantität erhalten.

Über das Resultat, das wir bei Untersuchung dieser Keimpflanzen auf Tryptophan erhielten, wird weiter unten berichtet.

B. 18—20tägige etiolierte Keimpflanzen von *Lupinus albus*.

Die in den Keimpflanzen von *Lupinus albus* sich vorfindenden Aminosäuren sind früher schon untersucht worden.¹⁾ Aus 6—7tägigen Pflänzchen solcher Art konnte leicht Leucin isoliert werden; daneben fand sich Tyrosin in kleiner Menge vor. In 2—3 wöchentlichen etiolierten Pflänzchen fand man Leucin, Aminovaleriansäure und Phenylalanin. Die beiden zuletzt genannten Aminosäuren lassen sich am leichtesten isolieren, wenn man nur die nach Abtrennung der Cotyledonen noch übrig bleibenden Teile der Pflänzchen, in denen Leucin nur in sehr kleiner Menge enthalten ist, für die Darstellung verwendet; verarbeitet man die ganzen Keimpflanzen, so erwächst für die Isolierung jener Aminosäuren eine Schwierigkeit aus dem ziemlich beträchtlichen Leucingehalt der Cotyledonen. In letzterem Falle gelang es nicht, reine Aminovaleriansäure darzustellen. Phenylalanin konnte durch Fällung mit Phosphorwolframsäure isoliert werden. Es war nun zu prüfen, ob mit Hilfe der Estermethode noch andere Aminosäuren sich nachweisen ließen.

Für die Veresterung verwendeten wir 123 g des rohen Aminosäurengemenges, dargestellt nach der oben im Abschnitt A beschriebenen Methode aus einem Quantum von ca. 11 kg lufttrockner etiolierter Keimpflanzen, die nach einer Vegetationsdauer von 18—20 Tagen geerntet worden waren. Da Pflänzchen von solchem Alter in Wasser und in Weingeist lösliche Kohlenhydrate nur noch in geringer Menge enthalten, so blieb bei Darstellung der Aminosäuren eine viel geringere Quantität von Mutterlauge übrig, als bei Darstellung der Aminosäuren aus 8—9tägigen Wickenkeimpflanzen. Ein Teil dieser Mutterlauge wurde für die Darstellung von Estern verwendet; doch wurde dabei nur ein kleines Quantum von Estern erhalten.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 411; Bd. XXX, S. 241 und Bd. XXXVIII, S. 199.

Bei der fraktionierten Destillation der aus jenen 123 g des Rohproduktes erhaltenen Ester zeigte sich, daß ein unter 60° übergehendes Produkt nicht vorhanden war. Über den Siedepunkt und die Quantität der verschiedenen Fraktionen gibt die folgende Tabelle Aufschluß:

	Druck	Siedepunkt	Gewicht ¹⁾
I.	14	60°	4
II.	14	60—80°	35
III.	13	80—100°	15
IV.	12	142°	8
V.	12	154°	6
VI.	12	195°	5

Die Fraktion I wurde in der von E. Fischer angegebenen Weise auf Glykokoll geprüft; doch war das Resultat ganz negativ. Die bei Verseifung der Fraktionen II und III erhaltenen Aminosäuren extrahierten wir mit Alkohol, dunsteten das Extrakt ein, wobei Geruch nach Pyrrolidin auftrat, nahmen es wieder in Alkohol auf und fällten es dann mit Äther. Wir erhielten eine geringe Menge einer Substanz, welche α -Pyrrolidinkarbonsäure sein konnte. Sie wurde in das Phenylcyanat, letzteres in das Hydantoin übergeführt. Dieses Produkt schmolz bei 138,5°, während das in entsprechender Weise aus α -Pyrrolidinkarbonsäure entstehende Hydantoin bei 143° schmilzt. Leider erhielten wir jene Substanz nur in so geringer Menge, daß wir sie nicht noch durch Umkristallisieren reinigen konnten; wäre letzteres möglich gewesen, so würde vermutlich der Schmelzpunkt unseres Produktes sich noch etwas erhöht haben. Wir haben somit das Vorhandensein von Pyrrolidinkarbonsäure zwar nicht sicher nachweisen können; für sehr wahrscheinlich aber darf es doch erklärt werden, daß diese Stickstoffverbindung sich vorfand. Ohne Zweifel aber war ihre Quantität eine äußerst geringe.

Es ist hier noch zu erwähnen, daß wir auch die von dem rohen Aminosäurengemenge abfiltrierte Mutterlauge, von der

¹⁾ Das Gesamtgewicht der Fraktionen betrug unter Hinzurechnung des bei der Destillation verbliebenen Rückstandes 83 g. Bei der Ueberführung des Aminosäurengemenges in die Ester hatten einige Verluste stattgefunden.

wir, wie oben schon erwähnt wurde, einen Teil verestert haben, auf Pyrrolidinkarbonsäure untersuchten. Doch haben wir einen sicheren Nachweis dieser Stickstoffverbindung hier nicht erbringen können.

Über die Art und Weise, in der wir die aus den Fraktionen I bis III erhaltenen Aminosäuren weiter behandelten, ist folgendes anzugeben:

Fraktion I. Die Aminosäuren dieser Fraktion wurden in die Kupfersalze übergeführt, letztere sodann bei Zimmertemperatur mit Methylalkohol behandelt, bis dieses Lösungsmittel nur noch eine äußerst geringe Substanzmenge aufnahm. Ungelöst blieb eine sehr geringe Menge eines Kupfersalzes, das bei der Zerlegung eine im Verhalten mit Leucin übereinstimmende Aminosäure lieferte. Die methylalkoholische Lösung wurde eingedunstet, der Verdampfungsrückstand in Wasser gelöst, die Lösung zur Kristallisation eingengt. Wir erhielten so ein im Aussehen dem aminovaleriansauren Kupfer gleichendes Kupfersalz. 0,3070 g des aus Wasser umkristallisierten Salzes gaben bei der Analyse 0,0825 g $\text{CuO} = 21,47\% \text{ Cu}$. (Die Theorie verlangt für aminovaleriansaures Kupfer den gleichen Kupfergehalt.)

Fraktion II. Die aus dieser Fraktion erhaltenen Aminosäuren wurden, nachdem sie zur Entfernung etwa vorhandener α -Pyrrolidinkarbonsäure mit Alkohol extrahiert worden waren, in die Kupfersalze übergeführt. Letztere extrahierten wir mit Methylalkohol, ohne jedoch diese Extraktion solange fortzusetzen, bis nichts mehr in Lösung ging. Die methylalkoholische Lösung wurde abfiltriert, der ungelöst gebliebene Teil der Kupfersalze mit Wasser behandelt, wobei eine stark blau gefärbte Lösung entstand. Dieselbe wurde vom Ungelösten abfiltriert und sodann eingedunstet, der Verdampfungsrückstand mit Methylalkohol behandelt. Der größte Teil dieses Rückstandes löste sich nach und nach auf, zurück blieb eine kleine Menge eines Kupfersalzes, welches bei der Zerlegung eine dem Leucin gleichende Aminosäure gab; der Stickstoffgehalt der letzteren wurde gleich 11,10% gefunden¹⁾

¹⁾ Analytische Belege: 0,2730 g Substanz gaben 27,4 ccm Gas bei 725 mm Druck und 17° C. = 0,03031 g oder 11,1% N.

(wahrscheinlich lag Leucin vor, dem noch ein wenig Aminovaleriansäure beigemischt war). Die von diesem Kupfersalz abfiltrierte methylalkoholische Lösung wurde der Destillation unterworfen, das dabei zurückbleibende Kupfersalz mittels Schwefelwasserstoff zerlegt, die so erhaltene Aminosäure zur Kristallisation gebracht und dann noch einmal aus Wasser unter Zusatz von etwas Weingeist umkristallisiert. Dieselbe bestand aus glänzenden Kristallblättchen, die sich beim Erhitzen im Glasröhrchen ohne Hinterlassung eines Rückstandes verflüchtigten. Die Analyse gab folgendes Resultat:

0,2222 g Substanz gaben 24,8 ccm Stickstoffgas
bei 720 mm Druck und 18° C. = 0,02711 g oder 12,14% N.

Der Formel der Aminovaleriansäure entspricht ein Stickstoffgehalt von 10,98%.

Ein aus dieser Aminosäure dargestelltes Kupfersalz gab bei der Analyse folgendes Resultat:

0,2770 g Substanz (bei 100° getrocknet) gaben 0,0734 g CuO
= 21,17% Cu.

Die Formel des aminovaleriansauren Kupfers verlangt 21,47% Cu.

Die im vorigen mitgeteilten Versuchsergebnisse berechtigen uns, die in der beschriebenen Weise erhaltene Aminosäure für Aminovaleriansäure zu erklären.

Der in Methylalkohol und in Wasser unlösliche Teil der Kupfersalze lieferte bei der Zerlegung mittels Schwefelwasserstoff eine im Aussehen und im Verhalten mit Leucin übereinstimmende Aminosäure. Ihre heiße wässrige Lösung gab auf Zusatz von Kupferacetat eine kristallinische, dem Leucinkupfer gleichende Ausscheidung. Die Analyse dieses Kupfersalzes lieferte folgende Resultate:

1. 0,2150 g Substanz gaben 0,0525 g CuO = 19,50% Cu

2. 0,2100 „ „ „ 0,0510 „ „ = 19,40% Cu.

Im Mittel wurden 19,45% Cu gefunden, während die Formel des Leucinkupfers 19,55% Cu verlangt.

Aminovaleriansäure und Leucin sind somit in der Fraktion II nachgewiesen worden.

Die bei der ersten Extraktion der Kupfersalze mit Methylalkohol erhaltene tiefblaue Lösung wurde der Destillation unterworfen; nachdem etwa die Hälfte des Methylalkohols über-

destilliert war, ließ man die rückständige Flüssigkeit erkalten. Aus derselben schied sich ein blaues Kupfersalz in beträchtlicher Quantität aus. In der davon abgegossenen Mutterlauge konnte Isoleucin enthalten sein. Das beim Verdunsten dieser Mutterlauge zurückbleibende Kupfersalz wurde daher mittels Schwefelwasserstoff zerlegt, die dabei erhaltene Aminosäure zur Kristallisation gebracht und analysiert. Die Stickstoffbestimmung gab folgendes Resultat:

0,1610 g Substanz gaben 17,4 ccm Gas bei 722 mm Druck und 17° C.
= 0,019164 g oder 11,91 % N.

Der Stickstoffgehalt dieses Präparates erreichte also fast denjenigen der Aminovaleriansäure. Daß aber auch Isoleucin nicht ganz fehlte, wird durch das Resultat wahrscheinlich gemacht, welches wir bei Analyse eines aus der methylalkoholischen Lösung erhaltenen, dann noch aus Wasser umkristallisierten Kupfersalzes erhielten. In diesem Kupfersalz wurden nämlich 20,78% Cu¹⁾ gefunden — eine Zahl, die hinter dem Kupfergehalt des aminovaleriansauren Kupfers (21,47 %) nicht unbedeutend zurückbleibt.

Die Fraktion II enthielt also Aminovaleriansäure und Leucin, vielleicht auch etwas Isoleucin. Ohne Zweifel war Aminovaleriansäure diejenige Aminosäure, welche der Quantität nach in dieser Fraktion prävalierte.

Fraktion III. Die beim Verseifen dieser Fraktion erhaltenen Aminosäuren wurden, nachdem sie zur Entfernung der α -Pyrrolidinkarbonsäure mit Alkohol extrahiert worden waren, in die Kupfersalze übergeführt, letztere sodann mit Methylalkohol extrahiert, bis dieses Lösungsmittel nur noch eine sehr geringe Substanzmenge aufnahm. Die methylalkoholische Lösung wurde durch Abdestillieren eines Teils des Lösungsmittels konzentriert, worauf eine Ausscheidung von Kupfersalz erfolgte. Die von letzterem abgegossene Mutterlauge wurde eingedunstet, das dabei zurückbleibende Kupfersalz durch Schwefelwasserstoff zerlegt, die so erhaltene Aminosäure zur Kristallisation gebracht. Die Analyse dieses Produktes gab folgendes Resultat:

¹⁾ Analytische Belege: 0,2146 g Substanz gaben 0,0558 g CuO = 20,78% Cu.

0,1859 g Substanz gaben 19,4 ccm Stickstoffgas
bei 723 mm Druck und 15° C. = 0,0216 g oder 11,62% N.

Diese Zahl liegt dem Stickstoffgehalt der Aminovaleriansäure weit näher als demjenigen des Isoleucins; wahrscheinlich lag also ein Gemenge von Aminovaleriansäure mit wenig Isoleucin vor.

Der in Methylalkohol unlösliche Teil der Kupfersalze lieferte bei der Zerlegung eine im Aussehen und Verhalten dem Leucin gleichende Aminosäure. Ihre heiße wässrige Lösung gab auf Zusatz von Kupferacetat eine dem Leucinkupfer gleichende Ausscheidung. Die Analyse dieses Produktes gab folgendes Resultat:

0,2220 g Substanz gaben 0,0545 g CuO = 19,60% Cu.

Die Theorie verlangt für Leucinkupfer einen Gehalt von 19,55% Cu.

Wie aus den im vorigen gemachten Angaben zu ersehen ist, lieferte auch hier, ebenso wie bei Untersuchung der aus Wickenkeimpflanzen dargestellten Aminosäuren, keine der drei ersten Fraktionen der Ester bei der Verseifung ein einheitliches Produkt; stets wurde ein Gemenge von Aminosäuren erhalten. Daß in diesem Gemenge neben Aminovaleriansäure und Leucin auch Isoleucin sich vorfand, darf für wahrscheinlich erklärt werden, obwohl die Isolierung der zuletzt genannten Aminosäure nicht gelang.

Die IV. Fraktion der Ester, verarbeitet nach der von E. Fischer gegebenen Vorschrift, lieferte Phenylalanin. Letzteres wurde mit Hilfe seiner Reaktionen, sowie durch Analyse seines Kupfersalzes identifiziert:

0,2798 g Substanz gaben 0,0568 g Kupferoxyd = 16,22% Cu.

Die Theorie verlangt für Phenylalaninkupfer einen Gehalt von 16,2% Cu.

Auch die Fraktionen V und VI lieferten Phenylalanin. Doch war dasselbe nicht ganz rein; wahrscheinlich war ihm etwas Asparaginsäure beigemengt. Die Ausbeute an Phenylalanin betrug im ganzen ungefähr 7 g.

Aus dem bei der Destillation der Ester verbliebenen Rückstand, dessen Gewicht 10 g betrug, ließen sich kristallisierte Substanzen nicht gewinnen.

Aus den Keimpflanzen von *Lupinus albus* ließ sich also auf dem von uns eingeschlagenen Wege α -Pyrrolidinkarbon-

säure in sehr kleiner Menge gewinnen; das Vorhandensein von Isoleucin konnte wahrscheinlich gemacht, aber nicht sicher bewiesen werden. Im übrigen konnten wir nur drei aus den genannten Keimpflanzen früher schon dargestellte Monoaminsäuren isolieren, nämlich Aminovaleriansäure, Leucin und Phenylalanin. Der Menge nach prävalierte ohne Zweifel die zuerst genannte Aminosäure; die Ausbeute an Leucin war kaum größer, als diejenige an Phenylalanin. Der Gehalt der Pflänzchen an Isoleucin kann nur relativ gering gewesen sein.

C. Untersuchung der Keimpflanzen auf Tryptophan.

Zur Untersuchung auf Tryptophan dienten vorzugsweise 8—9tägige Keimpflanzen von *Lupinus albus*. Sie wurden in frischem Zustand verarbeitet; für einen Versuch diente ein Quantum von 1750 g, für einen zweiten ein solches von 4,50 kg der frischen Pflänzchen.¹⁾ Dieselben wurden unter Zusatz von wenig Wasser zerkleinert, dann zur Gewinnung des Saftes mit Hilfe einer kräftig wirkenden Presse ausgepreßt. Die in solcher Weise gewonnene Flüssigkeit versetzten wir sofort mit Bleiessig; das Filtrat vom Bleiniederschlag wurde durch Zusatz von Schwefelsäure vom Blei befreit, dann mit soviel Schwefelsäure versetzt, daß der Gehalt der Flüssigkeit an dieser Säure fast 5% betrug. Hierauf setzten wir Quecksilbersulfat in kleinen Anteilen zu. Dieses Reagens erzeugte in der Flüssigkeit einen schwach gelblichen, nicht sehr voluminösen Niederschlag, der nach Verlauf von 1—2 Tagen abfiltriert, mit 5%iger Schwefelsäure gewaschen, dann in Wasser verteilt und durch Schwefelwasserstoff zersetzt wurde. Die vom Schwefelquecksilber abfiltrierte Flüssigkeit befreiten wir durch schwaches Erwärmen, bezw. Durchblasen von Luft vom Schwefelwasserstoff; dann wurde sie mit Hilfe von Baryt von der Schwefelsäure befreit. Die vom Baryumsulfat abfiltrierte Lösung gab mit Glyoxalsäure und Schwefelsäure sehr stark die Tryptophanreaktion (intensiv rote, später in violett übergehende Färbung). Diese Lösung wurde nun unter Zusatz von Alkohol bei gelinder

¹⁾ Der Trockensubstanzgehalt solcher Pflänzchen ist nicht hoch; er beträgt in der Regel höchstens ca. 10%.

Wärme stark eingeengt, dann unter eine Glasglocke über konzentrierte Schwefelsäure gestellt. Ein Teil der gelösten Substanz schied sich in fester Form aus, der größte Teil aber blieb sirupös. Es ließ sich leicht erkennen, daß hier nicht reines Tryptophan, sondern ein Gemenge des letzteren mit einer anderen Substanz vorlag. Wir konstatierten, daß die Substanz, welche die Tryptophanreaktion gab, beim Erhitzen mit Weingeist, dem ein wenig Wasser zugesetzt worden war, sich auflöste, während bei dieser Extraktion eine andere, nicht jene Reaktion gebende Substanz zurückblieb. Da bekanntlich die Reindarstellung des Tryptophans nicht ganz leicht ist, so konnten wir im Hinblick auf jenen Umstand kaum hoffen, aus unserer Lösung kristallisiertes Tryptophan zu erhalten; wir beschränkten uns daher auf die Untersuchung seiner Zersetzungsprodukte. Der beim Eindunsten der erwähnten Lösung verbliebene Rückstand wurde in einem Glaskolben bis zur Zersetzung erhitzt. Dabei trat der Geruch des Skatols auf; doch war ein anderer Geruch beigemengt. Den Inhalt des Glaskolbens behandelten wir nun mit Äther. Die durch Filtration vom Ungelösten getrennte ätherische Lösung gab beim Verdunsten einen stark nach Skatol riechenden Rückstand. Einen Teil dieses Rückstandes lösten wir in Weingeist; ein mit dieser Lösung befeuchteter, dann getrockneter Fichtenholzspahn nahm beim Eintauchen in Salzsäure eine intensive rote, allmählich in violett übergehende Färbung an (Reaktion auf Skatol). Den Rest jenes Rückstands lösten wir in Wasser. Die Lösung nahm beim Versetzen mit Salpetersäure und wenig Natriumnitrit keine Rotfärbung an (Indol fehlte also); dagegen gab sie auf Zusatz jener Reagentien eine weißliche Trübung, wie es für Skatol angegeben wird.

Die im vorigen mitgeteilten Beobachtungen lassen wohl keinen Zweifel darüber, daß in dem durch Quecksilbersulfat im Saft der Keimpflanzen hervorgebrachten Niederschläge Tryptophan sich vorfand.¹⁾

Auch die Keimpflanzen von *Vicia sativa* haben wir auf

¹⁾ Die Identität dieses Produktes mit dem von Hopkins und Cole isolierten Tryptophan ist freilich nicht bewiesen; es wäre möglich, daß ein Isomeres vorläge.

Tryptophan untersucht. Wir verwendeten aber in diesem Falle nicht den aus den Pflänzchen ausgepreßten Saft, sondern die sirupöse Mutterlauge, die nach dem Auskristallisieren des Rohleucins übrig geblieben war (man vergleiche die im Abschnitt A gemachten Angaben). Als diese Mutterlauge mit Wasser verdünnt, mit Schwefelsäure stark angesäuert und sodann mit Quecksilbersulfat versetzt wurde, entstand ein bräunlich gefärbter Niederschlag. Die aus letzterem bei der Zerlegung mittels Schwefelwasserstoff erhaltene Lösung war so stark braun gefärbt, daß sie nicht direkt auf Tryptophan geprüft werden konnte. Es zeigte sich jedoch, daß bei fraktionierter Fällung mit Quecksilbersulfat die färbende Substanz größtenteils in den zuerst entstandenen Niederschlag einging; die davon abfiltrierte Flüssigkeit gab auf weiteren Zusatz des Reagens eine viel weniger gefärbte Fällung, die auch bei der Zerlegung durch Schwefelwasserstoff eine nur wenig gefärbte Lösung lieferte. Diese Lösung gab mit Glyoxalsäure und Schwefelsäure Tryptophanreaktion. Der beim Eindunsten dieser Lösung verbliebene Rückstand wurde durch Erhitzen zersetzt, das dabei erhaltene Produkt mit Äther behandelt. Das ätherische Extrakt gab beim Verdunsten einen stark nach Skatol riechenden Rückstand. Somit ist anzunehmen, daß auch in den Wickenkeimpflanzen Tryptophan sich vorfand.

Rückblick auf die Resultate.

In den von uns untersuchten Keimpflanzen konnten wir drei aus solchem Material bisher noch nicht dargestellte Stickstoffverbindungen nachweisen, nämlich α -Pyrrolidinkarbonsäure, Isoleucin und Tryptophan. Doch gelang der Nachweis der α -Pyrrolidinkarbonsäure nur bei *Lupinus albus*; Isoleucin konnte nur aus den Keimpflanzen von *Vicia sativa* isoliert werden, fehlte aber höchstwahrscheinlich auch bei *Lupinus albus* nicht. Außer diesen drei Stickstoffverbindungen konnten wir auf dem von uns eingeschlagenen Wege nur drei früher schon in jenen Keimpflanzen nachgewiesene Aminosäuren, nämlich Aminovaleriansäure, Leucin und Phenylalanin, isolieren.

In den gleichen Keimpflanzenarten sind früher auch Tyrosin, Arginin, Lysin und Histidin nachgewiesen worden. Doch fanden sich diese Stoffe nebeneinander nur in Pflänzchen geringen Alters; aus 2—3 wöchentlichen Pflänzchen war z. B. Tyrosin nicht zur Abscheidung zu bringen. Dies erklärt sich, wenn man annimmt, daß manche der bei der Eiweißspaltung entstehenden primären Produkte im Stoffwechsel der Pflänzchen bald umgewandelt werden. Für diese Annahme sprechen auch wieder die jetzt von uns an *Lupinus albus* gemachten Beobachtungen. Wenn man aus 6—7tägigen Keimpflanzen dieser *Lupinus*-art Aminosäuren darstellt und dieselben näher untersucht, so findet man, daß vorzugsweise Leucin vorhanden ist; zwei- bis dreiwöchentliche etiolierte Keimpflanzen der gleichen Art liefern dagegen ein Aminosäurengemenge, in welchem neben Aminovaleriansäure und Phenylalanin eine relativ geringe Menge von Leucin sich vorfindet, offenbar deshalb, weil ein großer Teil des beim Eiweißzerfall entstandenen Leucins später im Stoffwechsel der Pflänzchen umgewandelt worden ist.

Von den bei der Spaltung der Eiweißstoffe durch Säuren entstehenden Aminosäuren sind einige auch bei der jetzt von uns ausgeführten Untersuchung der Wicken- und Lupinenpflänzchen nicht zum Vorschein gekommen. Als solche sind zunächst Glykokoll, Alanin und Glutaminsäure zu nennen, ferner auch die Oxyaminosäuren, deren Nachweis aber hier vielleicht mit Schwierigkeiten verbunden ist.

Das Fehlen einzelner Aminosäuren in dem in Keimpflanzen sich vorfindenden Gemenge von Eiweißzersetzungsprodukten läßt sich zwar durch die Annahme erklären, daß manche Stoffe solcher Art bald nach ihrer Bildung umgewandelt werden und sich infolge davon in den zur Untersuchung gelangenden Pflänzchen nur in einer zum Nachweis nicht genügenden Quantität vorfinden; aber man kann jene Erscheinung auch noch in anderer Weise erklären. Man weiß, daß die Eiweißstoffe durch Trypsin auch bei vorhergegangener Einwirkung von Pepsinsalzsäure nicht total in kristallinische Produkte gespalten werden, sondern daß dabei gewisse, der weiteren Verdauung starken Widerstand entgegensetzende Komplexe übrig bleiben,

die man als Polypeptide bezeichnet. Es ist nun möglich, daß auch in den Pflanzen bei Einwirkung proteolytischer Enzyme auf die Eiweißkörper Stoffe der gleichen oder ähnlicher Art neben Aminosäuren und Hexonbasen sich bilden und daß diese Komplexe dann diejenigen Bausteine der Eiweißkörper einschließen, die in den Keimpflanzen bis jetzt nicht zum Vorschein gekommen sind. Auch das sehr spärliche Auftreten mancher primären Eiweißzersetzungsprodukte, z. B. der Pyrrolidinkarbonsäure, in den Keimpflanzen könnte man unter jener Voraussetzung darauf zurückführen, daß der größte Teil dieser Produkte noch in den gleichzeitig gebildeten Polypeptiden enthalten ist. Es wird eine bei der weiteren Untersuchung der Keimpflanzen noch zu lösende Aufgabe sein, diese Frage zu entscheiden.

Als bemerkenswert kann wohl auch die von uns gemachte Beobachtung gelten, daß aminovaleriansaures Kupfer sich in Methylalkohol ebenso leicht löst wie Isoleucinkupfer und daß daher dieser von F. Ehrlich zur Isolierung des Isoleucins verwendete Alkohol auch bei der Trennung der aus Keimpflanzen darstellbaren Aminovaleriansäure von Leucin gute Dienste zu leisten vermag.

Über die bei der Hydrolyse der Eiweißsubstanz der Lupinensamen entstehenden Monoaminosäuren.

Von
E. Winterstein und E. Pantanelli.

(Aus dem agrikultur-chemischen Laboratorium des Polytechnikums in Zürich.)
(Der Redaktion zugegangen am 28. April 1905.)

Von den pflanzlichen Eiweißsubstanzen ist bis jetzt das Edestin die einzige, auf deren Spaltungsprodukte die Estermethode von E. Fischer angewendet worden ist. Im Hinblick auf die von E. Schulze und seinen Mitarbeitern im hiesigen Laboratorium erhaltenen Ergebnisse über das Auftreten von Aminosäuren in Keimpflanzen muß es als wünschenswert bezeichnet werden, zu untersuchen, welche Aminosäuren aus den in den bezüglichen Samen darstellbaren Eiweißsubstanzen entstehen. Darüber läßt sich am besten mit Hilfe der Fischerschen Methode Aufschluß erhalten.

Wir haben uns daher die Aufgabe gestellt, zu untersuchen, welche Aminosäuren aus dem Eiweiß der Lupinensamen entstehen. Was die Darstellung dieser Eiweißsubstanz betrifft, so wurde die Methode von Ritthausen benutzt, welche bekanntlich darin besteht, daß man die zerkleinerten und entfetteten Samen mit höchst verdünnter Natronlauge in der Kälte behandelt und das schwach alkalische Filtrat mit Essigsäure neutralisiert. Allerdings erhält man dabei keine einheitlichen Substanzen, bei der vorliegenden Untersuchung handelt es sich aber darum, die Eiweißsubstanz möglichst vollständig zu gewinnen, weil es ja auf einen Vergleich der dabei erhaltenen Produkte mit denen in den Keimpflanzen vorhandenen ankam und weil an dem Eiweißumsatz wahrscheinlich doch alle vorhandenen Eiweißstoffe sich beteiligen.

Wir verwendeten ein aus *Lupinus albus* und *Lupinus hirsutus* dargestelltes Eiweißpräparat. Die nach dem genannten Verfahren dargestellte Eiweißsubstanz wurde nach dem Ausfällen mit verdünnter Essigsäure mit Wasser und Alkohol ausgewaschen, unter absolutem Alkohol entwässert und zuletzt mit Äther ausgewaschen. Sie bildete ein weißes leicht zerreibliches Pulver.

Für die Hydrolyse verwendeten wir 200 g dieses Pulvers, welches mit einem Liter Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,19 ca. 8 Stunden am Rückflußkühler gekocht wurde. Die Zersetzungsflüssigkeit wurde im Vacuum zum Sirup eingedunstet, sodann wieder mit Salzsäure gesättigt, einige Kriställchen Glutaminsäure hinzugefügt und drei Tage im Eisschrank stehen gelassen; dabei schied sich eine dunkelgefärbte amorphe Masse aus, eine kristallinische Ausscheidung konnten wir nicht beobachten. Wahrscheinlich verhinderten die in größerer Menge vorhandenen Huminsubstanzen das Auskristallisieren der Glutaminsäure. Der Sirup wurde nun samt der erwähnten Ausscheidung 3 mal mit ca. einem Liter Alkohol nach der Methode von Fischer verestert und die Ester mit Hilfe von Natronlauge, Pottasche und Äther in Freiheit gesetzt. Bei der Veresterung war infolge eines Unfalls ein Teil der Substanz verloren gegangen. Daher erhielten wir eine relativ geringe Ausbeute an Estern. Die Ester wurden bei 7—8 mm Druck destilliert. Wir erhielten folgende Fraktionen.

Fraktion	Temperatur	Gewicht
I	20— 40°	6 g
II	40— 65°	12,4 „
III	65— 85°	30,9 „
IV	85—130°	8,5 „
V	130—150°	7,3 „
VI	150—180°	13,8 „
VII	180—185°	<u>4,7 „</u>
		83,6 g

Im Kolben verblieb ein brauner Rückstand, dessen Quantität 26 g betrug. Dieser Rückstand wurde in heißem Alkohol gelöst; aus der alkoholischen Lösung schieden sich in der Kälte allmählich Kristalle aus, deren Quantität nicht ausrei-

chend war, um eine genauere Untersuchung durchzuführen. Bei der Untersuchung der einzelnen Fraktionen erhielten wir folgende Ergebnisse:

Fraktion I.

Die 6 g Ester wurden mit Salzsäure gesättigt, mit etwas Alkohol versetzt und nach dem Einimpfen von Glykokolsterchlorhydrat im Eisschrank stehen gelassen. Eine kristallinische Ausscheidung trat nicht ein, somit war die Abwesenheit von Glykokoll konstatiert. Die Flüssigkeit wurde nun wiederholt mit Wasser eingedampft, die noch vorhandene Salzsäure mit Bleihydroxyd entfernt, und die vom Blei, mit Hilfe von Schwefelwasserstoff, befreite Lösung zur Kristallisation eingedunstet. Die ausgeschiedenen Kristalle wurden mit Hilfe von Kupferhydroxyd in das Kupfersalz verwandelt. Aus der konzentrierten Lösung schieden sich blättrige Kristalle aus, welche von der Mutterlauge getrennt wurden. Die daraus mit Hilfe von Schwefelwasserstoff regenerierte Verbindung besaß einen Gehalt von 14,58 % N.

0,1386 g Substanz gaben 11,4 ccm N bei 18° und 724 mm.

Da der N-Gehalt des Alanins 15,72 % beträgt, so lag wohl ein Gemisch von letzterem mit einer höheren Aminosäure vor. Die von den blättrigen Kristallen getrennte tiefblau gefärbte Mutterlauge wurde nahezu zur Trockne eingedunstet, die Kristalle auf einer Tonplatte von der Mutterlauge befreit. Diese Kristalle bestanden aus Alaninkupfer. Sie besaßen einen Gehalt von 26,20 % Cu und 11,57 % N. Die Theorie verlangt 26,30 % Cu und 11,61 % N.

0,200 g Substanz gaben 0,0524 g CuO

0,2250 „ „ „ 23,6 ccm N bei 720 mm und 16°.

Fraktion II.

Die 12,4 g Ester wurden am Rückflußkühler mit Wasser gekocht, aus der wässrigen Lösung wurden vier Kristallfraktionen hergestellt. Die erste gab mit Kupferacetat einen blauen Niederschlag vom Aussehen des Leucinkupfers, dasselbe wurde

nicht weiter untersucht. Die letzte Fraktion gab mit Kupferhydroxyd eine tiefblaue Lösung, aus dieser wurden 0,8 g Alaninkupfer isoliert. Die beiden mittleren Fraktionen wurden mit Kupferhydroxyd gekocht, die tiefblauen Lösungen eingedunstet, die ausgeschiedenen blättrigen Kristalle wurden mit Methylalkohol ausgekocht, die tiefblaue Lösung vom Rückstand getrennt und der Methylalkohol auf dem Wasserbade verjagt.

Der Rückstand wurde aus Wasser umkristallisiert; es wurden auf diese Weise 0,5 g eines Kupfersalzes gewonnen, dessen Kupfer und Stickstoffgehalt auf aminovaleriansaures Kupfer stimmte.

0,153 g Substanz gaben 13,6 ccm N bei 720 mm und 16°
= 0,0425 g N = 9,8%.

0,200 g Substanz gaben 0,0532 g CuO = 0,0425 g Cu = 21,24%.

Die Theorie verlangt 9,47% N und 21,46% Cu.

Fraktion III.

Beim Kochen der Ester mit Wasser schied sich ein hellgelb gefärbtes, schwefelhaltiges Öl aus, welches nach dem Verseifen im Scheidetrichter von der Lösung getrennt wurde; die Flüssigkeit wurde zur Trockne eingedunstet, der Rückstand mit absolutem Alkohol in der Wärme zweimal extrahiert. Die alkoholische Lösung wurde mit den aus den folgenden Fraktionen erhaltenen vereinigt.

Der beim Behandeln mit absolutem Alkohol verbliebene Rückstand wurde in heißem Wasser gelöst und zur Kristallisation eingedunstet, die nach längerem Stehen ausgeschiedenen Kristalle wurden von der Flüssigkeit getrennt und der Rückstand nochmals aus Wasser umkristallisiert, auf diese Weise wurden 6 g einer Aminosäure erhalten, welche im Verhalten dem Leucin glich, sie sublimierte vollständig, eine wässrige Lösung der Substanz gab mit Kupferacetat eine blaue kristallinische Ausscheidung, die Flüssigkeit war nach dem Erkalten nur schwach gefärbt. Eine weitere Untersuchung wurde mit dieser Substanz nicht ausgeführt. Die Mutterlaugen vom Leucin wurden eingedunstet, bis eine neue Ausscheidung von Aminosäuren eintrat, die ausgeschiedenen Kristalle wurden von der

Flüssigkeit getrennt und aus Wasser umkristallisiert, es resultierten blendend weiße Blättchen von einheitlichem Aussehen, von diesen wurde eine Elementaranalyse und eine N-Bestimmung nach Dumas mit folgendem Ergebnis durchgeführt:

0,2010 g Substanz gaben 0,1840 g H_2O und 0,4062 g CO_2
= 10,14% H und 55,11% C.

0,2220 g Substanz gaben 22,2 ccm Gas bei 716 mm und $16^\circ = 10,95\%$.

Aus der Formel $C_6H_{13}NO_2$ berechnet sich ein Gehalt von 10,01% H, 54,91% C und 10,68% N. Obige Zahlen stimmen also gut auf Leucin. Die Kristalle wurden mittels Kupferhydroxyd in das Kupfersalz verwandelt, die ausgeschiedenen Kristalle getrocknet und mit warmem Methylalkohol behandelt, wobei eine blau gefärbte Lösung resultierte, die vom Ungelösten getrennte methylalkoholische Lösung wurde eingedunstet, es hinterblieben 0,3 g eines Kupfersalzes, dessen Cu-Gehalt 19,64% betrug.

0,2500 g Substanz gaben 0,0615 g CuO = 0,0491 g Cu.

Da nach den Angaben von F. Ehrlich¹⁾ und auch nach den in unserem Laboratorium ausgeführten Untersuchungen das Kupfersalz des gewöhnlichen Leucins im Methylalkohol unlöslich ist, so schloß das analysierte Leucinpräparat etwas Isoleucin ein.

Fraktion IV.

Die Ester wurden mit Äther und Wasser geschüttelt, um den Phenylnanester abzuscheiden, die wässrige Lösung am Rückflußkühler gekocht, wobei auch hier eine kleine Menge eines schwefelhaltigen Öls scheinbar unverseift zurückblieb, die davon getrennte wässrige Lösung der Aminosäuren wurde zur Trockne eingedunstet, der Rückstand mit absolutem Alkohol ausgekocht. Die aus dieser Fraktion erhaltene alkoholische Lösung wurde mit derjenigen der vorhergehenden Fraktion vereinigt und der Destillation unterworfen; beim Behandeln des Destillationsrückstandes mit absolutem Alkohol in der Wärme verblieb noch ca. 1,5 g eines kristallinen Rückstandes; die alkoholische Lösung gab 7 g eines Sirups, den wir nicht zur Kristallisation bringen konnten. Der Sirup wurde mit Kupferhydroxyd gekocht und die entstandenen Kupfersalze nach

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Gesellschaft, Bd. XXXVII, S. 1809.

E. Fischer mittels Alkohol getrennt. Es wurde eine kleine Menge des im Alkohol unlöslichen Kupfersalzes der racemischen Pyrrolidinkarbonsäure erhalten. Das in Alkohol lösliche Kupfersalz gab nach dem Zerlegen mit Schwefelwasserstoff einen Sirup, der nicht kristallisieren wollte; ein Teil des letzteren wurde mit Phenylisocyanat und Lauge behandelt und die dabei erhaltene Verbindung mittels Salzsäure in das Anhydrid übergeführt, wir erhielten nach zweimaligem Umkristallisieren aus Wasser ein in schönen Nadeln kristallisierendes, bei 142° schmelzendes Produkt. Nach E. Fischer schmilzt das Hydantoinderivat der α -Pyrrolidinkarbonsäure bei 143° .

Fraktion V und VI.

Die Ester wurden nach den Angaben Fischers auf Phenylalanin, Asparaginsäure und Glutaminsäure verarbeitet. Es wurden 5 g Phenylalanin, 8 g Asparaginsäure und 0,2 g Glutaminsäure erhalten.

Ein Versuch, aus diesen Fraktionen Serin mittels Naphtalin-sulfochlorid¹⁾ zu isolieren, verlief resultatlos.

Fraktion VIII.

Das Estergemisch erstarrte nach kurzer Zeit kristallinisch. Dasselbe schloß anscheinend noch kleine Mengen Phenylalanin ein. Eine weitere Untersuchung der in dieser Fraktion enthaltenen Aminosäuren haben wir noch nicht durchgeführt. Es ist wohl nicht ausgeschlossen, daß die Untersuchung der höheren Fraktionen noch allerlei interessante Ergebnisse liefern wird.

Da das Konglutin beim Kochen mit Lauge und Bleiessig Bleisulfid gibt, so war auch zu prüfen, ob dieser Eiweißkörper bei der Spaltung mit Säuren Cystin liefert. Zur Isolierung dieses schwefelhaltigen Körpers benützten wir das von Patten²⁾ angegebene Verfahren. Die durch 10stündiges Kochen von Konglutin mit ca. 35%iger Schwefelsäure erhaltene Flüssigkeit wurde mittels Baryt von der Schwefelsäure befreit, die erhaltene

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 489. Siehe auch E. Fischer und P. Bergell, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., 1902, S. 3779.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 353.

Lösung eingeengt und mit Merkurisulfat bei Anwesenheit von Schwefelsäure gefällt; der mit Schwefelsäure ausgewaschene und gut abgepreßte Niederschlag lieferte nach dem Zersetzen mit Schwefelwasserstoff und Eindunsten eine dunkelgefärbte Flüssigkeit, aus welcher sich allmählich sechsseitige Täfelchen ausschieden, welche die Bleireaktion gaben. Durch diesen Befund ist auch die Anwesenheit des Cystinkomplexes im Konglutin erwiesen. Die auf diesem Wege erhaltene Cystinmenge war aber im Vergleich zum Schwefelgehalt des Konglutins so gering, daß man wohl auch die Anwesenheit anderer schwefelhaltiger Gruppen annehmen muß. Im Einklang mit dieser Auffassung steht wohl die Bildung eines scheinbar nicht verseifbaren schwefelhaltigen Öls, das sich in den Fraktionen II, III und IV in nicht unbeträchtlicher Menge vorfand. Auch beim Zersetzen eines aus Kolostrum dargestellten schwefelreichen Albumins beobachteten wir in unserem Laboratorium das Auftreten eines schwefelhaltigen Öls, auch bei diesem Eiweißkörper war die Ausbeute an Cystin eine sehr geringe.

Da das Konglutin die Molischsche Reaktion mit α -Naphthol und Schwefelsäure gibt, so wurden auch Versuche angestellt, reduzierende Substanz aus dem Konglutin abzuspalten. Die Versuche verliefen aber resultatlos. Da beim Behandeln der Samen mit Laugen auch Hemizellulosen in Lösung gehen können, so sollen diese Versuche mit pflanzlichen Eiweißsubstanzen durchgeführt werden, welche sich aus den Samen durch Extraktion mit Kochsalz gewinnen lassen.

Zusammenfassung der Resultate.

Aus den bei der Hydrolyse der Eiweißsubstanzen der Lupinensamen entstehenden Produkte konnten folgende Monoaminosäuren isoliert werden: Alanin, Aminovaleriansäure, Leucin, Isoleucin, α -Pyrrolidinkarbonsäure, Phenylalanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure und Cystin. Auf Tyrosin haben wir nicht geprüft, da dasselbe schon früher von E. Schulze¹⁾ unter den Spaltungsprodukten des von uns untersuchten Eiweißkörpers nachgewiesen worden ist.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. IX, S. 63.

Von besonderem Interesse ist der Nachweis, daß α -Pyrrolidinkarbonsäure in ansehnlicher Menge sich vorfand, während in den Keimpflanzen der Lupine diese Aminosäure nur in äußerst kleiner Menge gefunden werden konnte. Es ist daher nicht unwahrscheinlich, daß beim Abbau der Eiweißstoffe in den Keimpflanzen ein Polypeptid, welches diese Aminosäure einschließt, gebildet wird.

Ferner ist von Interesse der Nachweis der Aminovaleriansäure unter den Spaltungsprodukten der von uns untersuchten Eiweißsubstanz, diese Aminosäure ist in den Keimpflanzen schon vor langer Zeit nachgewiesen worden, über ihre Bildungsweise in den Keimpflanzen konnte man bisher verschiedener Meinung sein;¹⁾ nachdem sie aber auch bei der Spaltung des bezüglichen Eiweißkörpers mit Salzsäure erhalten werden konnte, kann wohl kein Zweifel mehr darüber bestehen, daß sie auch in den Keimpflanzen als primäres Produkt des Eiweißabbaues entsteht. Da die von uns untersuchte Eiweißsubstanz stark die Reaktion mit Glyoxalsäure und Schwefelsäure auf Tryptophan gibt, so darf man wohl auch die Anwesenheit dieser Stickstoffverbindung als Baustein des Konglutins ansehen.

Der Nachweis des Isoleucins unter den Spaltungsprodukten der von uns untersuchten Eiweißsubstanz ist ein weiteres Beispiel für das Auftreten dieser Aminosäure unter den Produkten des Eiweißabbaues. Es sei hier darauf hingewiesen, daß schon E. Schulze und A. Likiernik²⁾ es für möglich erklärt haben, daß unter den Spaltungsprodukten der Eiweißstoffe neben dem gewöhnlichen Leucin (α -Aminoisobutylelessigsäure) noch eine andere Aminokapronsäure sich vorfindet. Sie machen darauf aufmerksam, daß man erst nach wiederholtem Umkristallisieren des Rohleucins reine α -Aminoisobutylelessigsäure erhält und daß bei diesem Umkristallisieren ein etwa noch vorhandenes Leucin vollständig in die Mutterlauge übergeht.

¹⁾ O. Loew nimmt an, daß die Aminovaleriansäure aus dem Leucin hervorgehen kann. Die chemische Energie der lebenden Zelle, 1899, S. 81.

²⁾ Diese Zeitschrift, 1893, Bd. XVII, S. 534.

Zur Kenntnis der aus Ricinussamen darstellbaren Eiweißsubstanzen.

Von

E. Winterstein.

(Aus dem agrikultur-chemischen Laboratorium des Polytechnikums in Zürich.)

(Der Redaktion zugegangen am 28. April 1905.)

Wie von E. Schulze und mir¹⁾ nachgewiesen worden ist, bildet sich in den Keimpflanzen der Ricinussamen Ricinin $C_8H_8N_2O_2$. Da es für möglich erklärt werden muß, daß die Bildung dieser Base mit dem Abbau der Eiweißstoffe während des Vorgangs der Keimung zusammenhängt, so war es von Interesse, zu untersuchen, ob unter den Spaltungsprodukten, die man bei Hydrolyse der aus Ricinussamen darstellbaren Eiweißstoffe andere eigentümliche Stickstoffverbindungen erhält. Die von mir in dieser Richtung ausgeführten Versuche führten in der Tat zur Auffindung einer Stickstoffverbindung, welche in ihrer Zusammensetzung mit derjenigen des Lysins übereinstimmte, in dem Verhalten aber in einigen Punkten vom Lysin nicht unwesentlich abwich.

Durch Extraktion der entfetteten Ricinussamen mit verdünnter Lauge gehen größere Mengen von Eiweißsubstanzen in Lösung, es wurde daher zur Darstellung der Eiweißsubstanzen die Methode von Ritthausen benutzt. Ich verfuhr wie folgt: die grob gemahlenen Samen wurden mit Äther möglichst vollständig entfettet, der dabei verbliebene Rückstand nochmals zerkleinert, in mehrere große Zylinder verteilt und mit 0,2%iger Lauge 24 Stunden digeriert, die trübe Flüssigkeit wurde durch Dekantation vom Rückstand getrennt und letzterer so oft mit verdünnter Lauge (0,5%) behandelt, bis eine Probe der Lösung

¹⁾ Über das Vorkommen von Ricinin in jungen Ricinuspflanzen, Diese Zeitschrift, Bd. LXIII, S. 211.

mit Essigsäure keine Fällung mehr gab. Da die Filtration der alkalischen Flüssigkeit nicht durchführbar war, wurde diese trübe Lösung mit Essigsäure angesäuert, der Niederschlag auf ein Filter gesammelt, mit Wasser wiederholt ausgewaschen und dann mit absolutem Alkohol und Äther entwässert. Es resultierte so ein hellgraues, zerreibliches Pulver.

200 g dieser Substanz wurden durch 8stündiges Kochen mit konzentrierter Salzsäure zersetzt, die braune Zersetzungsflüssigkeit mit Wasser verdünnt und mit ca. 50 ccm konzentrierter Phosphorwolframsäurelösung versetzt, die dabei entstandene dunkle Fällung wurde durch Filtration von der nur noch schwach gefärbten Flüssigkeit getrennt und letzterer so viel Phosphorwolframsäurelösung zugefügt, bis auf weiteren Zusatz erst nach einiger Zeit eine Fällung auftrat. Diese Fällung wurde nach 2tägigem Stehen von der Flüssigkeit getrennt. Ehe ich nun die Darstellung der Base beschreibe, will ich nur einige Worte über die Verarbeitung des aminosäurehaltigen Filtrats mitteilen. Die saure Lösung wurde zunächst auf dem Wasserbade konzentriert, wobei sich eine große Menge von kristallinischen Phosphorwolframat ausschied, welche von der Flüssigkeit getrennt und mit Wasser etwas ausgewaschen wurden. Diese kristallinischen Wolframate lösten sich zum großen Teil in Alkohol auf; der im Alkohol unlösliche Rückstand und der im Alkohol lösliche wurden getrennt in bekannter Weise mit Baryt zersetzt, der gelöste Baryt mit Schwefelsäure quantitativ ausgefällt, die Flüssigkeiten beinahe zur Trockne eingedunstet; die ausgeschiedenen Kristalle wurden auf Tonplatten von der geringen Menge Mutterlauge befreit, es resultierten weiße glänzende Blättchen, die vorläufig nicht weiter untersucht wurden. Die von den kristallinischen Wolframat getrennte saure Flüssigkeit wurde in der Wärme mit Baryt schwach alkalisch gemacht, die farblose Lösung von dem schwach blau gefärbten Niederschlag getrennt, letzterer sodann mit viel Wasser ausgekocht, auf der Nutsche abgesogen und gut ausgewaschen, die Lösung wurde durch Schwefelsäure vom gelösten Baryt befreit und zur Sirupkonsistenz eingedunstet. Der schwach gelb gefärbte Sirup wurde nun nach der Methode von E. Fischer verestert.

Bei der Destillation der erhaltenen Ester unter einem Drucke von 8 mm wurden 4 Fraktionen erhalten, welche beim Verseifen Aminosäuren lieferten, die allem Anschein nach die bekannten Monoaminosäuren einschlossen.

Was nun die Verarbeitung des Phosphorwolframsäureniederschlages anbelangt, so ist folgendes anzugeben. Die Zersetzung dieser gut mit 5%iger Schwefelsäure ausgewaschenen Fällung geschah in bekannter Weise mit Baryt; um die großen Mengen Ammoniak, die bei dieser Eiweißzersetzung auftraten, auszutreiben, wurde während 48 Stunden ein starker Luftstrom durch die Basenlösung durchgeleitet, so daß eine herausgenommene abfiltrierte Probe mit Nesslerischem Reagens nur noch eine schwache Gelbfärbung gab. Die Flüssigkeit wurde nun vom Niederschlag abgesogen, letzterer mit Wasser verrieben und wieder abgenutscht, die vom Baryt befreite Basenlösung wurde mit Salpetersäure neutralisiert und die Basen nach der Methode von Kossel und Kutscher getrennt. Zur Reindarstellung des Histidins fällte ich die beim Zersetzen des Histidinsilberniederschlages mit Schwefelwasserstoff erhaltene konzentrierte Lösung mit Mercurisulfat nach den Angaben von Kossel und Patten¹⁾ aus; trotzdem ich, wie bemerkt, bei dieser Ausfällung eine sehr konzentrierte Lösung verwendete und die mit Quecksilbersulfat versetzte Lösung längere Zeit stehen ließ, enthielt doch die vom Quecksilbersulfat getrennte Flüssigkeit eine beträchtliche Menge einer Base, welche daraus in folgender Weise isoliert wurde. Aus der Lösung wurde das Quecksilber mit Hilfe von Schwefelwasserstoff und die Schwefelsäure durch Baryt quantitativ ausgefällt,²⁾ die farblose Basenlösung wurde mit Salzsäure neutralisiert und zur Kristallisation eingedunstet, aus dem Sirup schieden sich allmählich lange von Mutterlauge durchsetzte Nadeln aus. Ob hier der Ausfällung entgangenes Histidin oder ob eine vom letzteren verschiedene Base vorlag, vermag ich zur Zeit noch nicht zu sagen.

Die Lysinfraktion behandelte ich in etwas anderer Weise, als es von Kossel und Kutscher angegeben ist. Die Flüssig-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 41.

²⁾ Der Niederschlag wurde mit heißem Wasser gut ausgewaschen.

keit, in welcher das Lysin enthalten sein mußte, wurde mit Salzsäure ganz schwach sauer gemacht und bis zur Sirupkonsistenz eingedunstet; nach längerem Stehen über Natronkalk erstarrte die Masse nahezu vollständig, sie wurde nun wiederholt mit Methylalkohol ausgekocht, wobei der größte Teil in Lösung ging; die methylalkoholische Lösung gab nach dem Eindunsten Kristalle, die sich als Lysinchlorid erwiesen. Dasselbe wurde durch sein charakteristisches Platindoppelsalz identifiziert. Das in Methylalkohol unlösliche Chlorid hatte ein etwas anderes Aussehen, als das gewöhnliche Lysinchlorid, es bestand aus kugligen Aggregaten. Die Quantität der in beschriebener Weise isolierten Substanz betrug 0,3 g; da diese Quantität für eine weitere Untersuchung nicht ausreichte, wurden noch ca. 300 g Eiweiß in gleicher Weise und ferner 150 g durch Kochen mit Schwefelsäure nach Kossel und Kutscher zersetzt. Im letzteren Falle trennte ich das Arginin und Histidin mit Silbernitrat und Baryt, ohne vorhergehende Fällung der Basen mit Phosphorwolframsäure; ich erhielt nun 0,8 g Substanz, welche noch kleine Menge Ammonchlorid einschlossen. Die Gesamtmenge wurde in möglichst wenig Wasser gelöst, mit einer absolut alkoholischen Lösung von Platinchlorid versetzt, wobei einige Milligramme Ammoniumplatinchlorid sich abschieden, welche von der Flüssigkeit getrennt wurden; aus der verschlossen aufbewahrten Lösung schied sich auch auf Zusatz von absolutem Alkohol kein weiteres Platindoppelsalz aus, auf Zusatz von Äther entstand eine sirupöse Ausscheidung, die Lösung trocknete im Exsikkator zu einer amorphen elastischen Masse ein. Diese wurde in Wasser gelöst, durch Schwefelwasserstoff vom Platin befreit, die saure Lösung eingedunstet und über Natronkalk aufgestellt, bis nur noch eine kleine Menge Mutterlauge verblieb, die ausgeschiedenen Kristalle wurden auf einer Tonplatte von der Mutterlauge befreit und einmal aus Wasser umkristallisiert.

Die so erhaltene Substanz besaß folgende Eigenschaften: Sie war optisch aktiv. Bei der Bestimmung des spezifischen Drehungsvermögens erhielt ich folgendes Ergebnis. Eine wässrige Lösung der Substanz, welche in 10 ccm 0,6 g ent-

hielt, drehte im 200 mm Rohr $4,5^{\circ}$ nach rechts, daraus berechnet sich $(\alpha)_D = + 12,9^{\circ}$. Die wässrige Lösung zeigte folgende Reaktionen:

Phosphorwolframsäure . . . Weiße, im Überschuß unlösliche, beim Erwärmen lösliche Fällung.

Phosphormolybdänsäure . . Gelbliche Fällung, von gleichem Verhalten wie obige.

Pikrinsäure 0

Goldchlorid 0

Platinchlorid 0

Quecksilberchlorid 0

Mercurisulfat 0

Gerbsäure 0

Gerbsäure + Natronlauge . . Amorphe Fällung.

Kaliumquecksilberjodid . . . 0

Neflers Reagens Weiße Fällung.

Quecksilberchlorid + Lauge

Kaliumwismuthjodid Zinnoberrote, stark glänzende kristallinische Fällung.

Bei der Analyse der über Natronkalk getrockneten Substanz¹⁾ erhielt ich folgende Zahlen:

0,1464 g Substanz²⁾ gaben 0,1800 g CO_2 und 0,0947 g H_2O

Daraus berechnet sich ein Gehalt von 33,54% C und 7,24% H

0,0979 g Substanz gaben 11,5 ccm Gas bei 19° und 711 mm = 12,8% N

0,0942 „ „ „ 10,95 „ „ „ 19° „ 730 „ = 12,8% N

0,1130 „ „ „ 0,1486 g AgCl = 32,38% Cl.

Diese Zahlen stimmen mit Ausnahme des Kohlenstoffgehaltes sehr gut auf Lysindichlorid.

Berechnet für $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5 \cdot 2 \text{HCl}$:

C = 32,90%

H = 7,38%

N = 12,81%

Cl = 32,36%

Gefunden:

C = 33,54%

H = 7,24%

N = 12,80%

Cl = 32,38%

Bedenkt man, daß die Kohlenstoffbestimmung von chlorhaltigen Substanzen etwas zu hoch ausfallen kann — wegen Substanzmangels wurde die Analyse nicht wiederholt —, so ist

¹⁾ Hierzu wurde die bei Polarisation benutzte Lösung eingedunstet.

²⁾ Die Substanz wurde mit Bleichromat unter Vorlegung einer Kupfer- und Silberspirale verbrannt.

man auf Grund des Analysenergebnisses wohl berechtigt, anzunehmen, daß die in beschriebener Weise isolierte Substanz ein Isomeres des Lysins¹⁾ ist. Das erhaltene Dichlorid weicht allerdings nur im Verhalten gegenüber Platinchlorid, mit welchem kein kristallinisches Doppelsalz erhalten werden konnte, und ferner im Verhalten gegenüber Kaliumwismuthjodid ab; mit letzterer Verbindung gibt das salzsaure Salz eine in sechsseitigen Täfelchen kristallisierende dunkelrote, diamantglänzende Doppelverbindung. Die kristallinische Fällung tritt noch bei Anwendung von einem Milligramm Substanz sofort auf. Die Substanz weicht ferner noch im Schmelzpunkt vom Lysindichlorid ab. Während das gewöhnliche Lysindichlorid bei 194° schmilzt, begann das in beschriebener Weise von mir dargestellte schon bei 155° zu sintern und schmolz bei 160°, bei 162° trat Aufschäumen ein.

Zur Isolierung des in Rede stehenden Körpers benutzte ich Methylalkohol, in welchem das sauer reagierende Dichlorid des Lysins unlöslich ist. Wie eben gesagt, wurde die aus der Lysinfraction erhaltene Basenlösung mit Salzsäure bis zur schwach sauren Reaktion versetzt; daher war es möglich, daß nicht alles vorhandene Lysin in das Dichlorid verwandelt wurde; da aber das neutral reagierende Monochlorid des Lysins im Methylalkohol sich nicht löst, so muß es für wahrscheinlich erklärt werden, daß der beim Behandeln der Chloride mit Methylalkohol verbliebene Rückstand noch etwas Lysinchlorid einschloß. Der größte Teil aber bestand wohl aus einem in seinen Reaktionen vom Lysin abweichenden Körper. Wäre dies nicht der Fall gewesen, so würde ich nicht schon mit einem Milligramm dieses Rückstandes die charakteristische rote kristallinische Fällung mit Kaliumwismuthjodid erhalten haben.

Ich habe eine ganze Reihe Lysine verschiedener Herkunft bezüglich des Verhaltens gegenüber Kaliumwismuthjodid geprüft und mich dabei überzeugt, daß keines derselben mit dem genannten Reagens eine Fällung gibt. Ich bin den Herren Kossel,

¹⁾ Kutscher und Lohmann weisen in ihrer Arbeit über die Pankreasselbstverdauung auf die Existenz verschiedener Lysine hin. Diese Zeitschrift, Bd. XLI (1904), S. 339. Siehe auch Bd. XLIV, S. 383.

Kutscher, Siegfried, Abderhalden zu großem Dank für die Zusendung einiger Lysinpräparate verpflichtet, insbesondere aber möchte ich Herrn Dr. Schenk für die Überlassung einer größeren Kollektion von Lysinpräparaten verschiedener Herkunft meinen besten Dank aussprechen.

Die weitere Fortführung der Untersuchung dieses Körpers dürfte aber vielleicht deshalb auf Schwierigkeiten stoßen, als man so geringe Ausbeuten der bezüglichen Substanz erhält. Der Weg, um diese in ihrem Verhalten vom Lysin abweichende Substanz vom letzteren vollständig zu trennen, ist durch das Verhalten der beiden Chloride gegen Kaliumwismuthjodid gegeben. Ich würde diesen Weg schon eingeschlagen haben, wenn ich genügend Substanz zur Verfügung gehabt hätte.

Ich erwähne noch, daß ich behufs Abkürzung der Darstellung des in Rede stehenden Körpers in einem Falle wie folgt verfuhr: Ein Kilogramm entschälter Ricinussamen wurden entfettet, fein gemahlen, mit Wasser, um das Ricinin zu entfernen, ausgekocht, der nun verbliebene Rückstand mit Salzsäure gekocht und im weiteren, wie oben angegeben, verfahren. Ich erhielt dabei aber kein Chlorid, welches mit Kaliumwismuthjodid eine Fällung gab.

Vielleicht findet sich dasselbe in den in Wasser löslichen Eiweißsubstanzen, welche sich beim Eindunsten des wässerigen Extraktes allmählich ausschieden.

Übrigens sei noch darauf aufmerksam gemacht, daß die aus verschiedenen Mustern der gleichen Samenarten dargestellten Eiweißpräparate auch bei gleicher Behandlung zuweilen recht verschiedene Ausbeuten an einzelnen Basen geben. Während z. B. die aus Erbsen darstellbare Eiweißsubstanz, das Legumin, in einem Falle 5% Lysin gab, lieferte ein aus einer anderen Erbsensorte dargestelltes Eiweißpräparat bei der in gleicher Weise ausgeführten Spaltung nur ungefähr 2% Lysin.

Das von mir aus den Ricinussamen mit Natronlauge isolierte Eiweißpräparat enthielt nur 13,6% Stickstoff; es ist denkbar, daß dasselbe noch kleine Mengen Kohlenhydrate einschloß, welche durch die Natronlauge in Lösung gegangen waren. Dieses Eiweißpräparat lieferte beim Zersetzen mit Säuren größere Aus-

beuten an Arginin, als andere aus Pflanzensamen darstellbare Eiweißsubstanzen; in einem Falle betrug die Ausbeute an Arginin 16,6%. Im Einklang mit diesen hohen Ausbeuten an Arginin steht auch der große Gehalt an Stickstoff, welcher in den Phosphorwolframsäureniederschlag eingeht; dieser auf den «Huminstickstoff», den Ammoniakstickstoff und die Basen entfallende Stickstoff betrug 39% des Gesamtstickstoffs des in beschriebener Weise isolierten Eiweißpräparates.

Über ein Verfahren zur Isolierung des Lysins.

Von

E. Winterstein.

(Aus dem agrikultur-chemischen Laboratorium des Polytechnikums in Zürich.)
(Der Redaktion zugegangen am 28. April 1905.)

Bei der Untersuchung der basischen Spaltungsprodukte der aus Ricinussamen darstellbaren Eiweißsubstanzen — (siehe vorhergehende Arbeit) — wurde die Beobachtung gemacht, daß das Lysin mit Neßlerschem Reagens, beziehungsweise mit Quecksilberchlorid bei Anwesenheit einer fixen Base eine weiße Fällung gibt; es verhält sich also das Lysin in dieser Beziehung wie das Arginin beziehungsweise das Histidin. Da man nun diese beiden letzten Basen nach dem Verfahren von Kossel und Kutscher leicht vom Lysin mit Hilfe von Silbernitrat und Baryt trennen kann, so kann man die Fällbarkeit des Lysins durch Quecksilberchlorid bei Anwesenheit von Baryt zur Abscheidung des Lysins benutzen. Folgende Versuche beweisen, daß man mit Hilfe von Quecksilberchlorid und Baryt das Lysin unter Umständen ziemlich vollständig aus Basengemischen abscheiden kann.

Versuch I. 0,2 g Lysindichlorid wurden mit 0,1 g Arginin-nitrat gemischt, aus der wässerigen Lösung dieses Gemisches wurde das Arginin mit Silbernitrat und Baryt abgeschieden; die vom Silberargininniederschlag getrennte Flüssigkeit wurde nach Entfernung des Silbers mit einer konzentrierten Lösung von Mercurichlorid versetzt, die dabei entstandene Fällung wurde nach 24 stündigem Stehen auf ein Filter gebracht, gut ausgewaschen, mit salzsäurehaltigem Wasser verrieben und mit Schwefelwasserstoff zersetzt, die vom Quecksilbersulfid getrennte Flüssigkeit wurde zum Sirup eingedunstet. Es wurden in dieser Weise 0,170 g Lysindichlorid wiedergewonnen.

Versuch II. 0,2 g Lysinchlorid wurden mit einer kleinen Menge Histidin und Arginin gemischt, die beiden letzten Basen

nach Kossel und Kutscher getrennt und das in Lösung verbliebene Lysin in gleicher Weise abgeschieden, wie bei Versuch I angegeben ist.

Versuch III. 0,5 g Lysinchlorid wurden in 100 ccm Wasser gelöst, mit soviel einer konzentrierten Lösung von Quecksilberchlorid versetzt, bis eine herausgenommene Probe eine gelbe Fällung gab, die Flüssigkeit wurde nun mit Baryt im geringen Überschuß versetzt, die entstandene Fällung nach 24 stündigem Stehen abfiltriert, nahezu barytfrei gewaschen und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Es wurden in dieser Weise 0,495 g Lysinchlorid wiedergewonnen. Die vom Quecksilberniederschlag getrennte Lösung wurde mittels Schwefelsäure vom Baryt befreit, die Spuren vorhandenen Quecksilbers mit Schwefelwasserstoff entfernt und die Flüssigkeit mit Salzsäure versetzt; es hinterblieb eine äußerst kleine Menge eines Rückstandes, der zum größten Teil aus anorganischen Salzen¹⁾ bestand.

Ob sich dieses Verfahren zur Abscheidung des Lysins aus Eiweißzersetzungsprodukten, ohne vorhergehende Abscheidung des Basengemisches mit Phosphorwolframsäure eignet, erscheint zweifelhaft,²⁾ da ein Gemisch von Aminosäuren beziehungsweise reines Leucin mit Mercurichlorid und Baryt bei gewissen Mengenverhältnissen dieser beiden letztgenannten Reagentien allerdings nicht sofort gefällt wird; erwärmt man aber die barythaltige Leucinlösung, welche keinen Überschuß an Mercurichlorid enthält, so tritt alsbald eine Fällung auf. Hingegen dürfte dieses Verfahren wohl geeignet sein, das Lysin zur Abscheidung zu bringen, wenn man die Basen vorher mit Phosphorwolframsäure von den Aminosäuren getrennt hat. Da, wie ich mich überzeugt habe, das Kadaverin, das Putrescin, das Ornithin, welche auch in die Lysinfraction eingehen, mit Mercurichlorid und Baryt gefällt werden, so kann man diese Basen vom Lysin in der angegebenen Weise nicht trennen.

¹⁾ Herrührend vom Baryt.

²⁾ Dieses Verfahren dürfte sich aber wohl zur Abscheidung des Lysins aus pflanzlichen Objekten eignen.

Über das spezifische Drehungsvermögen einiger aus Pflanzen dargestellten Tyrosinpräparate.

Von

E. Schulze und E. Winterstein.

(Aus dem agrikultur-chemischen Laboratorium des Polytechnikums in Zürich.)
(Der Redaktion zugegangen am 28. April 1905.)

In einer vor drei Jahren publizierten Abhandlung¹⁾ teilten wir Resultate mit, die bei der Untersuchung einiger aus den Keimpflanzen von Cucurbita Pepo und aus Kartoffelknollen dargestellten Tyrosinpräparate erhalten worden waren. Diese Präparate zeigten ein relativ hohes spezifisches Drehungsvermögen; als wir ihre Lösung in 4%iger Salzsäure im Soleil-Ventzkeschen Polarisationsapparat untersuchten, wurde $[\alpha]^{D^{16}}$ gleich $-14,6$ bis $-16,1^{\circ}$ gefunden, während Emil Fischer²⁾ bei Anwendung des gleichen Lösungsmittels für ein durch Spaltung von Casein durch Salzsäure dargestelltes Tyrosinpräparat $[\alpha]^{D^{20}} = -12,56^{\circ}$, für ein zweites Präparat $[\alpha]^{D^{20}} = -13,2^{\circ}$ fand (ein noch niedrigeres Resultat, nämlich $[\alpha]^{D^{16}} = -11,6^{\circ}$ erhielten wir bei Untersuchung von Tyrosin, welches ebenfalls durch Spaltung einer Eiweißsubstanz mittels Salzsäure gewonnen worden war). Bei Mitteilung jener Resultate wiesen wir aber darauf hin, daß Emil Fischer (loc. cit.) bei der Spaltung von racemischem Tyrosin in die optisch aktiven Komponenten ein rechtsdrehendes Präparat erhalten hat, für welches bei Anwendung des gleichen Lösungsmittels $[\alpha]^{D^{20}} = +16,4^{\circ}$ gefunden wurde; dieses Präparat drehte also noch etwas stärker nach rechts, als das von uns aus Kartoffelknollen dargestellte Tyrosin nach links. Für diese Differenzen würde man, wie an jener Stelle von uns aus-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXV, S. 299.

²⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXII, S. 3646.

gesprochen wurde, eine Erklärung haben, wenn man annehmen könnte, daß den bei der Spaltung von Eiweißstoffen durch Säuren erhaltenen Tyrosinpräparaten racemisches Tyrosin in wechselnder Quantität beigemischt ist.

In unserer Abhandlung teilten wir mit, daß es in unserer Absicht liege, aus den Knollen von *Dahlia variabilis*, einem an Tyrosin relativ reichen pflanzlichen Objekt, noch ein Präparat dieser Aminosäure darzustellen und auf sein spezifisches Drehungsvermögen zu untersuchen. Dahliaknollen, die wir im Frühjahr 1903 verarbeiteten, gaben eine sehr geringe Ausbeute an Tyrosin; besser war die Ausbeute aus Knollen, die wir im folgenden Jahre untersuchten. Die Darstellung des Tyrosins aus letzteren geschah in folgender Weise: Die zerriebenen Knollen wurden mit kochendem 80%igen Alkohol behandelt. Das durch Filtration vom Ungelösten getrennte Extrakt unterwarfen wir der Destillation; der dabei erhaltene Rückstand wurde in Wasser aufgenommen, die Lösung zur Reinigung zuerst mit Tannin, später noch mit Bleiessig versetzt. Dem Filtrat vom Bleiniederschlag wurde Mercurinitrat in schwachem Überschuß, sodann zur Abstumpfung der Säure noch etwas Natriumkarbonat zugefügt. Die dadurch erzeugte Fällung wurde nach Verlauf einiger Tage abfiltriert, ausgewaschen, dann in Wasser verteilt und durch Schwefelwasserstoff zersetzt. Das Filtrat vom Schwefelquecksilber lieferte, nachdem es mit Ammoniak neutralisiert und so dann im Wasserbade stark eingeeengt worden war, eine aus Tyrosin bestehende Ausscheidung. Da dieses Produkt noch ziemlich stark gefärbt war, so lösten wir es in verdünnter Ammoniakflüssigkeit und fügten der Lösung unter Umschütteln etwas Bleiessig zu. In den dadurch hervorgebrachten Niederschlag ging neben einem kleinen Teile des Tyrosins die färbende Substanz ein. Die von diesem Niederschlag abfiltrierte Flüssigkeit wurde durch Zusatz von etwas Schwefelammonium vom Blei befreit, nach der Filtration im Wasserbade eingeeengt und sodann unter eine Glasglocke über konzentrierte Schwefelsäure gestellt. Das Tyrosin schied sich nach und nach aus der Flüssigkeit aus. Durch Umkristallisieren aus Wasser unter Zusatz von etwas Ammoniakflüssigkeit noch weiter gereinigt, bildete es eine

aus glänzenden nadelförmigen Kristallen bestehende Masse. Im Kapillarröhrchen schmolz es gleichzeitig mit einem Tyrosinpräparat anderer Herkunft. Die Stickstoffbestimmung lieferte folgende Resultate:

1. 0,1858 g Substanz (bei 100° getrocknet) gaben 13,4 ccm Gas bei 713 mm Druck und 16° C. = 0,01464 g oder 7,88% N.
2. 0,2402 g Substanz (bei 100° getrocknet) gaben 17,0 ccm Gas bei 710 mm Druck und 16° C. = 0,01857 g oder 7,71% N.

Im Mittel wurden also 7,80% N gefunden, während die Theorie 7,73% verlangt.

Die Untersuchung des aus den Dahliaknollen dargestellten Tyrosins im Soleil-Ventzkeschen Polarisationsapparat gab folgendes Resultat:

Eine Lösung in 4%iger Salzsäure, welche in 25 ccm 2,2676 g wasserfreie Substanz enthielt, drehte im 200 mm-Rohr bei 20° C. 6,8° nach links; demnach ist $[\alpha]^{20}_D = -12,9^\circ$.

Die salzsaure Lösung des für diese Bestimmung verwendeten Tyrosinpräparates wurde nun mit Ammoniak genau neutralisiert, das dabei sich ausscheidende Tyrosin später abfiltriert, mit kaltem Wasser gut ausgewaschen, dann getrocknet und wieder im Polarisationsapparat untersucht. Wir erhielten nun folgendes Resultat:

Eine Lösung in 4%iger Salzsäure, welche in 25 ccm 2,0910 g wasserfreie Substanz enthielt, drehte im 200 mm-Rohr bei 20° C. 6,1° nach links; demnach ist $[\alpha]^{20}_D = -12,5^\circ$.

Die Differenz zwischen dieser und der im ersten Versuch gefundenen Zahl liegt innerhalb der Fehlergrenze unserer Bestimmungen. Wie man sieht, weichen diese Zahlen nur wenig von denjenigen ab, welche E. Fischer bei Bestimmung des spezifischen Drehungsvermögens von zwei durch Spaltung einer Eiweißsubstanz mit Salzsäure erhaltenen Tyrosinpräparaten erhielt. (Diese Zahlen sind oben schon angegeben worden.)

Wir bestimmten ferner noch das spezifische Drehungsvermögen eines Tyrosinpräparates, welches bei der Autolyse junger Keimpflanzen von *Lupinus albus* erhalten worden war. Dieses Präparat war durch Auflösen in verdünnter Salpetersäure und Wiederausfällen mit Ammoniak, sowie durch Umkristallisieren

aus Wasser unter Zusatz von etwas Ammoniakflüssigkeit gereinigt; es bestand aus weißen glänzenden Kristallnadeln. Die Untersuchung der salzsauren Lösung im Soleil-Ventzkeschen Polarisationsapparat lieferte folgendes Resultat:

Eine Lösung in 4 % iger Salzsäure, die in 10 ccm 0,5292 g wasserfreie Substanz enthielt, drehte bei 16 ° C. im 200 mm-Rohr 5,0° nach links; demnach ist $[\alpha] D^{20} = -16,2^{\circ}$.

Von den aus Pflanzen gewonnenen Tyrosinpräparaten, die von uns untersucht worden sind, besaß also nur das aus Dahliaknollen dargestellte ein spezifisches Drehungsvermögen,¹⁾ wie es auch für das durch Spaltung von Eiweißstoffen mit Säuren erhaltene Tyrosin gefunden wurde; die drei anderen Präparate zeigten ein höheres Drehungsvermögen. Es ist nun die Frage zu stellen, ob diese drei Präparate noch Beimengungen enthielten und ob durch letztere das Drehungsvermögen erhöht wurde. Bestimmte Anhaltspunkte für eine solche Annahme liegen nicht vor. Jene drei Präparate glichen im Aussehen vollkommen dem gewöhnlichen Tyrosin; für zwei Präparate wurde ferner konstatiert, daß ihr Schmelzpunkt mit demjenigen des Tyrosins übereinstimmte. Auch wurde durch die Analyse festgestellt, daß das aus Kartoffelknollen dargestellte Präparat den Stickstoffgehalt des Tyrosins besaß (die beiden anderen Präparate sind nicht analysiert worden).

Falls man nun nicht anzunehmen hat, daß jene drei Präparate noch Beimengungen einschlossen, so muß man wohl zur Erklärung ihres stärkeren Drehungsvermögens auf die oben schon ausgesprochene Annahme zurückkommen, daß den bei der Spaltung von Eiweißstoffen durch Säuren erhaltenen Präparaten racemisches Tyrosin beigemischt ist, und daß dadurch ihr Drehungsvermögen herabgedrückt wird. Auch zur Erklärung des relativ niedrigen Drehungsvermögens des aus Dahliaknollen erhaltenen Tyrosins würde man anzunehmen haben, daß dem-

¹⁾ Allerdings hatten wir auch ein stärker drehendes Tyrosinpräparat aus Dahliaknollen unter Händen (Diese Zeitschrift, Bd. XXXV, S. 311); da dasselbe jedoch noch gefärbt war und da infolge davon der genauen Feststellung seines Drehungsvermögens Schwierigkeiten entgegenstanden, so konnten wir auf diese Beobachtung keinen Wert legen.

selben entweder racemisches oder rechtsdrehendes Tyrosin in geringer Menge beigemischt ist. Eine solche Annahme kann nicht als eine unzulässige bezeichnet werden; denn es sind von früher her schon Fälle bekannt, in denen einer optisch aktiven Stickstoffverbindung, die aus pflanzlichem oder tierischem Material abgeschieden wurde, eine kleine Quantität von racemischer oder von entgegengesetzt drehender Substanz gleicher Art beigemengt war.¹⁾

¹⁾ Bezügliche Angaben haben wir in dieser Zeitschrift, Bd. XXXV, S. 300, gemacht. Zu erwähnen ist hier auch, daß nach F. Ehrlich (Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVII, S. 1820) ein aus Melasseschlempe dargestelltes Leucinpräparat neben Isoleucin *r*-Leucin und *l*-Leucin einschloß und daß O. E. v. Lippmann aus Rübensaft ein in salzsaurer Lösung rechtsdrehendes Tyrosin gewann.

Über das Vorkommen der Guanase in der Rindermilz und ihr Fehlen in der Milz des Schweines.

Von
Walter Jones.

(Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium der Johns Hopkins University.)
(Der Redaktion zugegangen am 1. Mai 1905.)

In einer früheren Mitteilung¹⁾ ist gezeigt worden, daß während die meisten andern Drüsen die Fähigkeit haben, die Amidogruppe sowohl vom Guanin wie vom Adenin abzuspalten, wobei Xanthin resp. Hypoxanthin entsteht, die Milz offenbar nur einen dieser Prozesse hervorrufen kann, denn unter den Selbstverdauungsprodukten dieser Drüse erscheint Guanin, doch ist Adenin durch Hypoxanthin ersetzt. Dies Verhalten der Milz läßt sich nur durch die Annahme erklären, daß die Umwandlung der Aminopurinverbindungen in anderen Drüsen auf der Wirksamkeit zweier verschiedener Fermente beruht, von denen eins in der Milz fehlt. Dieses Ferment, dessen Vorhandensein später im Pankreas²⁾ erwiesen wurde, zeigte die Fähigkeit, eingeführtes Guanin in Xanthin überzuführen, und wurde «Guanase» bezeichnet.

Inzwischen erschien die höchst interessante Arbeit von Schittenhelm³⁾ über die Bildung von Harnsäure in Gewebs-extrakten. Er zeigte, daß wässrige Infuse verschiedener Organe bei Körpertemperatur unter ausreichender Zufuhr von Luft eine quantitative Umwandlung des Guanins in Harnsäure hervorrufen und daß dies in charakteristischer Weise durch die Milz geschieht. Da es schwer verständlich ist, wie die Milz bei Zufuhr von Luft Guanin in Harnsäure verwandeln

¹⁾ Jones, Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 35.

²⁾ Jones und Partridge, Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 343.

³⁾ Schittenhelm, Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 251.

kann, ohne bei Luftabschluß irgend einen Einfluß auf das Guanin auszuüben, schien es von Wichtigkeit, zu wissen, ob Adenin bei Einführung in die Milz in Hypoxanthin verwandelt wird, während doch Guanin hierbei unverändert bleibt. Die experimentellen Resultate rechtfertigten meine frühere Annahme, daß ein wässeriger Milzinfus völlig unfähig ist, Guanin in Xanthin zu verwandeln, die analoge Umwandlung des Adenins aber mit größter Leichtigkeit hervorruft.¹⁾ Das hierbei wirk-same Ferment mußte notwendig verschieden von der «Guanase» sein und erhielt den Namen «Adenase». Diese Abnormalität war offenbar auch Schittenhelm aufgefallen, denn in einer späteren Arbeit zeigte er,²⁾ daß eine verhältnismäßig große Menge von Guanin (0,900 g) nach der Einführung in 600 ccm sehr verdünnten Milzextrakt ohne Zufuhr von Luft innerhalb von 14 Tagen völlig verschwindet; an Stelle davon fand er 0,18 g Harnsäure und 0,77 g Xanthin. Hieraus folgert er dies:

«Meine Versuche haben des weiteren ergeben, daß, so zutreffend und wichtig die Untersuchungen Jones' über die Bildung von Xanthin aus Guanin in der Thymusdrüse, dem Pankreas und der Nebenniere sind, seine Beobachtung betreffs der Milz nicht zutrifft, wonach dieselbe eine Ausnahmestellung einnehmen und diese Funktion nicht besitzen soll. . . . Es muß also angenommen werden, daß die Harnsäurebildung, welche auf ganz bestimmte Organe beschränkt ist, durch die Tätigkeit zweier Fermente zustande kommt, eines desamidierenden, welches die Überführung von Guanin in Xanthin und Adenin in Hypoxanthin ermöglicht. Das desamidierende Ferment, welches für Guanin und Adenin jedenfalls dasselbe ist, sodaß eine Einzelbenennung als «Guanase» und «Adenase» nicht nötig erscheint, bis nicht das Gegenteil bewiesen wird, erfreut sich einer weiten Verbreitung im Tierkörper und scheint so ziemlich in jedem Organ vorhanden zu sein.»

Da ich an Schittenhelms Befunden keinen Zweifel hegte, andererseits den meinigen traute, schien mir die Ver-

¹⁾ Jones und Partridge, Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 1.

²⁾ Schittenhelm, Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 228.

schiedenheit unserer Resultate ihre Erklärung in einer von zwei Hypothesen zu finden. Einerseits kann in der Milz eine inaktive Vorstufe der Guanase existieren, welche Schittenhelm bei der Darstellung seiner Extrakte oder auf andere Weise ohne sein Wissen aktiviert hat, andererseits mag Guanase in aktiver Form tatsächlich in der Milz vorkommen und nur durch einen Eingriff zerstört sein, den ich ebenfalls unbewußt bei meiner Arbeit vorgenommen habe. Keine der beiden Annahmen kann jedoch in irgend einer Weise meine frühere Überzeugung erschüttern, nämlich daß die beiden amidspaltenden Fermente nicht identisch sind; denn sei nun eine inaktive Form der Guanase möglich, oder sei die Guanase zerstört, während die Adenase noch wirksam ist, die beiden Fermente müssen verschieden sein.

Beim Versuch, die Bedingungen zu erforschen, unter denen Guanase in der Milz aktiviert wird, gelang es mir, eine Menge Beweismaterial dafür zu erbringen, daß Adenase bei Abwesenheit von Guanase wirksam sein kann, und ich machte eine geringe Abänderung bei der Isolierungsmethode, wodurch man die Überführung von Adenin in Hypoxanthin quantitativ erweisen kann, während sich Guanin unter genau denselben Bedingungen quantitativ wiederfindet. Das Guanin wurde in den wässrigen Milzextrakt unter verschiedenen Bedingungen seitens Temperatur, Säuregehalt und Konzentration hineingegeben; die Menge des Chloroforms, das desinfizieren sollte, wurde variiert. Ferner wurden verschiedene Vorsichtsmaßregeln ergriffen: Der Milzextrakt wurde nämlich dargestellt mit destilliertem Wasser, mit Leitungswasser und Salzlösungen verschiedener Konzentration. Dann wurde das Guanin als Sulfat, Chlorid, als freie Base, in alkalischer und in sehr verdünnter salzsaurer Lösung eingeführt, das Resultat war aber immer dasselbe: Guanin findet sich wieder, während Adenin in Hypoxanthin übergeht. Schließlich kam mir der Gedanke, der große Unterschied zwischen Schittenhelms Resultaten und den meinigen könnte auf der Verschiedenheit der Tierspezies beruhen, von denen die Milzen entnommen wurden, da Schittenhelm ausschließlich mit Rindermilz gearbeitet hatte,

ich aber nur die Milz vom Schwein verwandte. Mein erster Versuch mit Rindermilz überzeugte mich davon, daß dem so sei. Die Rindermilz enthält Guanase in sehr großer Menge; die Schweinemilz aber nicht die leiseste Spur. Guanase und Adenase sind somit verschiedene Fermente.

Wie erwähnt, haben wir ein großes Beweismaterial dafür, daß Adenase unabhängig von Guanase wirksam sein kann. Zwei der überzeugendsten Versuche mögen hier angeführt werden:

I. Ein wässriger Extrakt der Schweinemilz wurde dargestellt aus einer Mischung von fein zerteilter Drüsensubstanz mit dem Sechsfachen ihres Gewichtes kalten, destillierten Wassers und einer ausreichenden Menge Chloroform zur Verhinderung der Fäulnis, wobei man im Laufe von 24 Stunden häufig umschüttelte. Nun wurde die Flüssigkeit durch ein leinenes Tuch gepreßt, so gut als möglich durch Zentrifugieren von festen Partikeln befreit und nach 24stündigem Stehen durch Hinzufügen von Soda die vorhandene Säure neutralisiert. Die Menge der aus 400 ccm eines auf diese Weise herzustellenden Extraktes entstehenden Xanthinbasen ist im Vergleich zur Quantität Xanthinbasen, die bei den Digerierungen verwandt wurden, so gering, daß ihre Vernachlässigung kaum die Resultate beeinflussen kann.

Eine Mischung von salzsaurem Guanin und Adeninsulfat wurde in heißem Wasser suspendiert und mit Hilfe von möglichst wenig Natronlauge in Lösung gebracht. Diese Lösung der Basen wurde nach dem Abkühlen in 400 ccm Schweinemilzextrakt gegossen und die Mischung nach weiterer Hinzufügung von Chloroform in einem gutschließenden Gefäß im Thermostaten bei 38—40° gehalten. Das Guaninchlorhydrat war aus analysenreinem Guanin dargestellt und sechsmal aus 3% iger Salzsäure umkristallisiert. Das Adeninsulfat war aus einem Pikrat gewonnen und fand sich analysenrein. Um es ganz sicher von Spuren Hypoxanthin frei zu machen, wurde es jedoch noch sechsmal aus sehr verdünnter Schwefelsäure umkristallisiert. Die Hinzufügung der Basenlösung veränderte das Aussehen des Milzextraktes nicht.

Angewandte Menge

Guaninchlorhydrat 0,360 g

Adeninsulfat 0,360 „

Nachdem die Digerierung 8 Tage fortgesetzt, währenddem häufig frische Luft zugelassen war, wurde die Flüssigkeit mit einigen Tropfen Essigsäure und der gleichen Menge Wasser versetzt, zum Kochen erhitzt und heiß filtriert, der Filtrerrückstand wurde verschiedene Male mit Wasser gekocht, dann wurden die vereinigten Filtrate auf ca. 500 ccm eingedampft. Die heiße Flüssigkeit wurde nun solange mit verdünnter Schwefelsäure behandelt, als noch ein Niederschlag entstand. Dieser (den ich bisher noch nicht untersucht habe, der aber sowohl die scharfe Fällung der Xanthinbasen durch Silbernitrat und Ammoniak beeinträchtigt, als auch die folgende Spaltung der Silberfällung mit Salzsäure) wurde abfiltriert, die Flüssigkeit ammoniakalisch gemacht, worauf die Xanthinbasen nach Abfiltrieren von phosphorsaurer Ammoniakmagnesia mit etwas überschüssigem Silbernitrat in Ammoniak gefällt wurden. Nach Aufschwemmung der Silberfällung in heißem Wasser wurde sie mit Salzsäure gespalten. Das Chlorsilber wurde abfiltriert und die Flüssigkeit über Nacht stehen gelassen, doch erfolgte keine Abscheidung von Harnsäure. Um den größten Teil der freien Säure zu entfernen, wurde jetzt fast zur Trockne eingedampft, der Rückstand mit Wasser (50—60 ccm) aufgenommen und Ammoniak im Überschuß bis zu einem Gehalt von $1\frac{1}{2}\%$ in der ganzen Flüssigkeit hinzugefügt. Das ausgeschiedene Guanin wurde mit $1\frac{1}{2}\%$ iger Ammoniaklösung digeriert, dann filtriert, gewaschen, in Natronlauge gelöst, mit Essigsäure gefällt und in das Chlorhydrat übergeführt.

Wiedergefundenes Guaninchlorhydrat 0,300 g = 83%.

Die ammoniakalischen Filtrate wurden nun weiter mit Silbernitrat in Ammoniak gefällt und die Silberfällung mit Salzsäure gespalten. Die gelbe, saure Flüssigkeit wurde zu wiederholten Malen zur Trockne eingedampft, zuerst mit Wasser, schließlich mit Alkohol. Der voluminöse Rückstand löste sich mit Leichtigkeit in Wasser von 40°, wobei nur eine unbe-

deutende Menge einer stark gefärbten Masse zurückblieb. Sowohl Harnsäure als Xanthin fehlten. Ein Tropfen der wässerigen Lösung gab keinen Hinweis auf Adenin bei Behandlung mit Pikrinsäure, doch erfolgte alsbald ein gelber Niederschlag, wenn nachher eine geringe Menge Adeninsulfat hinzugefügt wurde. Somit fehlte also Adenin. Jetzt wurde die ganze Flüssigkeit mit Silbernitrat in Ammoniak behandelt und die Silberfällung mit Schwefelwasserstoff gespalten. Das Filtrat vom Schwefelsilber (von dem ein Tropfen mit Pikrinsäure keinen Niederschlag gab) wurde zur Trockene eingedampft und der Rückstand aus sehr verdünnter Salpetersäure kristallisieren gelassen. Es zeigten sich die charakteristischen gleichmäßigen Kristalle des Hypoxanthinnitrates, welche nur eine orangegelbe Farbe aufwiesen, entsprechend der Farbenreaktion mit Salpetersäure und Natronlauge. Es konnte sich nur um reines Hypoxanthinnitrat handeln.

Gefundenes Hypoxanthinnitrat $0,342 \text{ g} = 95\%$ des eingeführten Adenins.

Somit ist Adenin durch den Schweinemilzextrakt vollständig in Hypoxanthin verwandelt, während Guanin in demselben Gefäß und unter genau denselben Bedingungen unverändert bleibt.

II. Der eben beschriebene Versuch ist hinlänglich überzeugend, und so erschien es zwecklos, Guanin in den Milzextrakt einzuführen, in der Erwartung, daß es verschwinden würde, da doch die Milz nicht imstande ist, die nur relativ kleine Menge Guanin ihres eigenen Nucleoproteids umzuwandeln. Ein Schweinemilzextrakt wurde aus 1500 g Drüsensubstanz und 3800 g destilliertem Wasser hergestellt, die abgepreßte Flüssigkeit in zwei gleiche Portionen geteilt und bei $38\text{--}40^\circ$ der Autodigestion überlassen. Der eine Teil wurde nach 8 Tagen weiter verarbeitet, der andere 52 Tage bei 40° stehen gelassen. Jede Portion wurde auf Guanin untersucht; um jedoch genau vergleichbare Versuchsergebnisse zu erhalten, wurden immer gleiche Mengen Filtrat angewandt, wobei auf den Rest von Filtrat und Niederschlag verzichtet wurde, damit durch ungenügendes Auswaschen kein Irrtum entstehen konnte.

Guaninchlorhydrat nach	8tägiger Digestion	0,155 g
„	52 „	0,140 g.

Somit kann innerhalb von 44 Tagen eine relativ große Menge Schweinemilzextrakt keine irgendwie erhebliche Verminderung der Guaninmenge hervorrufen.

Bei der Rindermilz liegt die Sache völlig anders. Ein aus 2800 g dieser Drüse und dem Fünffachen seines Gewichtes an Wasser hergestellter Extrakt wurde 9 Tage lang bei einer Temperatur von 38—40° der Selbstverdauung überlassen, worauf die Produkte auf die oben schon beschriebene Weise auf Xanthinbasen untersucht wurden. Es konnte keine Spur von Guanin, Adenin oder Hypoxanthin gefunden werden. Die Xanthinfraction wurde erst mit kaltem, dann mit kochendem Wasser säurefrei gewaschen, aber das Waschwasser gab bei der Behandlung mit Silbernitrat und Ammoniak nur einen Nebel und keinen deutlich abgeschiedenen Niederschlag. Die Xanthinfraction wurde deshalb mit der Horbaczewskischen Methode auf Harnsäure und Xanthin untersucht und es ergaben sich schließlich 0,8 g Xanthin und 0,250 g Harnsäure. Ich war also imstande, die Schittenhelmsche Beobachtung zu bestätigen, daß durch einen Extrakt von Rindermilz ohne Zulassung von Luft eingeführtes Guanin und Adenin schnell in eine Mischung von Xanthin und Harnsäure verwandelt werden. Somit steht die Rindermilz in einem deutlichen Gegensatz zur Milz des Schweins nicht nur durch ihren Gehalt an Guanase, sondern auch durch die erhebliche Menge Oxydase, welche Hypoxanthin in Xanthin und Harnsäure umwandelt.

In einer neuerschienenen Mitteilung konstatiert Schenck,¹⁾ daß eine Mischung der Pankreasextrakte vom Schwein und Rinde Adenase, aber keine Guanase liefert. Dies brachte mich auf den Gedanken, daß möglicherweise die Schweinemilz nicht allein keine Guanase enthalte, sondern sogar einen die Guanase hemmenden Körper. Versuche erwiesen jedoch, daß dem nicht so ist. Eine Mischung von 200 ccm Rindermilzextrakt und 400 ccm Schweinemilzextrakt mit 0,500 g Guaninchlorhydrat wurde 14 Tage lang bei 38° gehalten. Aus den Produkten

¹⁾ Schenck, Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 406.

wurde 0,160 g Harnsäure und 0,150 g Xanthin isoliert; das Guanin war völlig verschwunden.

Die Beobachtungen von Schenck sind in verschiedener Beziehung von großem Interesse. Seine Resultate zeigen, daß gewisse Bedingungen, die man zurzeit nicht näher beschreiben kann, die Wirksamkeit der Guanase im Pankreas verhindern können. Während ich immer übereinstimmende Resultate in bezug auf die Pankreasfermente hatte, ergab sich in der Schweinemilz das erratische Auftreten der Oxydase oft hinreichend deutlich. Ursprünglich war als Resultat einer Reihe von Versuchen festgestellt worden, daß die Schweinemilz kein Ferment enthält, das Hypoxanthin in Xanthin überführen könnte; jedoch gelegentlich (und besonders nach Einführung von Adenin und nachdem die Digestion besonders lange gedauert hatte) war zweifellos eine teilweise Umwandlung des Hypoxanthins in Xanthin eingetreten. Doch kann man in der großen Mehrzahl der Fälle kein Xanthin finden.

Es ist kaum nötig, hinzuzufügen, daß die Resultate von Schenck einen unabhängigen Beweis für den Hauptinhalt dieser Arbeit liefern, daß nämlich Guanase und Adenase zwei verschiedene Fermente sind.

Synthese von Oxy- und Diaminosäuren.

II. Mitteilung.¹⁾

Über Diaminokorksäure und Diaminosebacinsäure.²⁾

Von

Carl Neuberg.

(Aus dem chemischen Laboratorium des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)
(Der Redaktion zugegangen am 8. Mai 1905.)

Zu den seit langem bekannten Eiweißspaltungsprodukten, den gewöhnlichen aliphatischen und aromatischen Aminomonocarbonsäuren und den durch Drechsels grundlegende Arbeiten aufgefundenen Diaminomonocarbonsäuren, ist vor Jahresfrist durch Skraups³⁾ überraschende Befunde eine neue Klasse von Bausteinen der Proteinsubstanzen gestellt worden, die Diaminopolycarbonsäuren. Wenn auch im einzelnen die Konfiguration dieser sowie der kurz darauf von Wohlgemuth⁴⁾ auf etwas anderem Wege erhaltenen Substanzen noch nicht aufgeklärt ist, so lassen sich doch mit Sicherheit unter diesen folgende Gruppen unterscheiden:

1. Diaminodicarbonsäuren, z. B. Diaminoglutarsäure $C_6H_{12}N_2O_4$ und Diaminoadipinsäure $C_6H_{14}N_2O_4$.

2. Oxydiaminodicarbonsäuren wie Oxydiaminokorksäure $C_8H_{16}N_2O_6$, dann die Oxydiaminosebacinsäure $C_{10}H_{20}N_2O_5$, die Caseansäure $C_9H_{16}N_2O_6$ und die Caseinsäure $C_{12}H_{16}N_2O_5$.

Die Vertreter der letztgenannten Klasse verdienen deshalb ein ganz besonderes Interesse, weil sie augenscheinlich Zwischen-

¹⁾ I. Mitteilung: Synthese der Oxyaminobernsteinsäure, Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 147 (1905).

²⁾ Vorgetragen in der Sitzung der Deutschen chemischen Gesellschaft zu Berlin am 28. November 1904.

³⁾ Zd. H. Skraup, Diese Zeitschrift, Bd. LXII, S. 274 (1904); Wiener Monatshefte, Bd. XXVI, S. 245 (1905).

⁴⁾ J. Wohlgemuth, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVII, S. 4362 (1904).

glieder zwischen Zuckern und Aminosäuren darstellen, Substanzen, die früher nur in einzelnen Repräsentanten bekannt waren, wie dem Serin¹⁾ $\text{CH}_2\text{OH}\cdot\text{CH}\cdot\text{NH}_2\cdot\text{COOH}$, der Oxy-
pyrrolidincarbonsäure²⁾ und einer Tetraoxyaminocapro-
säure,³⁾ zu denen auch die Oxyaminokorksäure $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_6$,
die Diaminotrioxydodekansäure und die Oxyaminobern-
steinsäure gehören. Nur Serin und Oxyaminobernsteinsäure
sind bisher synthetisch erhalten, das erstere von E. Fischer
und Leuchs,⁴⁾ sowie von Erlenmeyer⁵⁾, die zweite von Neu-
berg und Silbermann.⁶⁾ Vertreter der ersten erwähnten Gruppe,
der reinen Diaminodicarbonsäuren, sind künstlich bisher nur
ganz vereinzelt erhalten.

So relativ einfach der künstliche Aufbau der bekannten
aliphatischen Monoaminodicarbonsäuren (Asparaginsäure, Glu-
taminsäure) sich gestaltet hat, so wenig ließ sich die Möglichkeit
einer glatten Synthese von Diaminodicarbonsäuren voraussehen.
Denn während sich der Austausch von Halogen in den α -Brom-
oder Chlorfettsäuren sowohl gegen Amid wie Hydroxyl bei
allen Gliedern der Essigsäurereihe mit angenähert gleicher Leich-
tigkeit vollzieht, bestehen bei den entsprechenden Dihalogen-
dicarbonsäuren, in der Malonsäurereihe, große Differenzen.
Rich. Willstätter⁷⁾ hat gezeigt, daß bei dem niedrigsten
Glieder, der Dibrommalonsäure $\text{COOH}\cdot\text{CBr}_2\cdot\text{COOH}$ überhaupt
kein einfacher Ersatz der zwei Halogenatome gegen Amid möglich
ist. Bei der α - α -Dibrombernsteinsäure



¹⁾ Cramer, Journ. f. prakt. Chemie, Bd. XCVI, S. 76 (1865);
E. Fischer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXV, S. 2660 (1902).

²⁾ E. Fischer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXV, S. 2660 (1902).

³⁾ C. Neuberg und A. Orgler, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII,
S. 407 (1903).

⁴⁾ E. Fischer und Leuchs, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXV,
S. 3790 (1902).

⁵⁾ E. Erlenmeyer jun., Ber., Bd. XXXV, S. 3769 (1902), und
Ann. d. Chem., Bd. CCCXXXVII, S. 236 (1904).

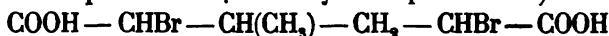
⁶⁾ C. Neuberg und M. Silbermann, Diese Zeitschrift, Bd. XLIV,
S. 147 (1905). Eine weitere Synthese hat auch Erlenmeyer angekündigt.

⁷⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXV, S. 1379 (1902).

konstatierte Lehrfeld¹⁾, daß sie sich nur zum kleinen Teil in die entsprechende Diaminosäure überführen läßt, während die Hauptmenge nach C. Neuberg und Silbermann (l. c.) in ganz andere Produkte, z. B. Acetylendicarbonsäure, resp. Acetylen übergeht. Die α - α_1 -Dibromadipinsäure²⁾



und die α - α_1 -Dibrom- β -Methyl-Adipinsäure³⁾



liefern nach Willstätter bei Behandlung mit NH_3 cyclische Körper, die ein N-Atom enthalten, Dicarbonsäuren des Pyrrolidins. Die α - α_1 -Dibrompimelinsäure⁴⁾



erleidet bei Einwirkung von wässrigem Ammoniak gleichfalls Ringschluß, ergibt aber eine stickstofffreie Substanz, die Δ -Cyclopentendicarbonsäure. Aus ihrem Ester dagegen gewann Emil Fischer mit flüssigem Ammoniak wiederum ein heterozyklisches Derivat, die α -1,5-Piperidindicarbonsäure.⁵⁾ Ähnliche Unterschiede treten bei der Behandlung derselben Dihalogendicarbonsäuren mit Alkalien auf, die bald zu den entsprechenden Dioxysäuren, bald unter Abspaltung von Halogenwasserstoff zu ein- oder zweifach ungesättigten Säuren führt.

Deshalb sind, abgesehen von der erwähnten, von Tafel⁶⁾ übrigens noch auf ganz anderem Wege gewonnenen α - α_1 -Diaminobernsteinsäure keine α - α_1 -Diaminosäuren dieser Reihe bekannt.⁷⁾

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XIV, S. 1817.

²⁾ R. Willstätter und Lessing, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXV, S. 2065 (1902).

³⁾ Rich. Willstätter und v. Sicherer, Berichte d. Deutschen chem. Ges., Bd. XXXII, S. 1290 (1899).

⁴⁾ R. Willstätter, Berichte d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXVIII, S. 657 (1895).

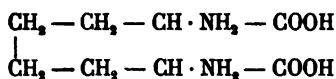
⁵⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIV, S. 2544 (1901).

⁶⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XX, S. 244 (1887) u. Bd. XXVI, S. 1890 (1893).

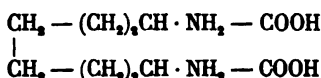
⁷⁾ Erhalten ist noch eine ähnlich konstituierte β - β_1 -Diaminodicarbonsäure, die β - β_1 -Diaminoadipinsäure; sie ist auf indirektem Wege von W. Traube (Ber., Bd. XXXV, S. 4121) und W. Köhl (Ber., Bd. XXXVI, S. 172) dargestellt.

Dieselben haben nun, wie erwähnt, in letzter Zeit ein aktuelles Interesse erlangt, nachdem Skraup Vertreter dieser Körperklasse unter den hydrolytischen Zersetzungsprodukten des Caseins aufgefunden und J. Wohlgemuth nachstehende Substanzen durch Spaltung des Nucleoproteids der Leber erhalten hat.

Da gerade die Kenntnis der höheren, kohlenstoffreicheren Diaminosäuren dieser Reihe im Hinblick auf ihre Beziehung zu den Fetten von Wert ist, habe ich die Synthese solcher versucht und gefunden, daß sich zunächst die α - α_1 -Diaminokorksäure

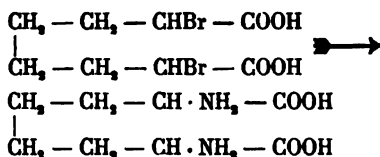


und die α - α_1 -Diaminosebacinsäure

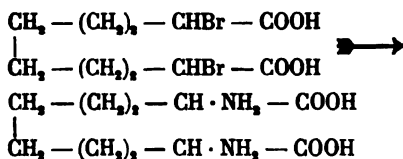


leicht gewinnen lassen.

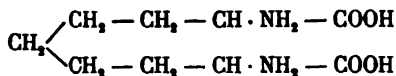
Die Säuren entstehen aus den entsprechenden leicht zugänglichen α - α_1 -Dibromsäuren durch Behandlung mit konzentriertem wässrigen Ammoniak und Ammonkarbonat bei 125°; es liefert die Dibromkorksäure die Diaminokorksäure:



die Dibromsebacinsäure die Diaminosebacinsäure:¹⁾



¹⁾ Auf analogem Wege haben Neuberg und Federer die α - α_1 -Diaminoazelaissäure

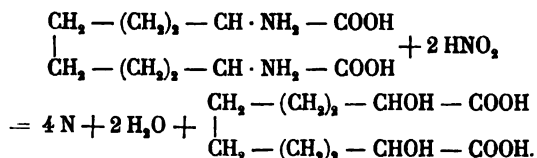


inzwischen synthetisch erhalten.

Wegen ihrer Schwerlöslichkeit können sie leicht vom gleichzeitig entstandenen Bromammonium befreit werden. Ihrer Zusammensetzung als Diaminodicarbonsäuren entsprechend vereinigen sie in sich den Charakter von Mono- und Diaminosäuren. In Rücksicht auf das Vorkommen ähnlicher Substanzen unter den hydrolytischen Spaltungsprodukten der Eiweißkörper wurde ihr Verhalten zu Fällungsmitteln und bei einer Reihe von Reaktionen eingehender untersucht.

Die Säuren selbst sind sogar in der Siedehitze äußerst schwer in Wasser löslich. Dagegen werden sie leicht von Mineralsäuren sowie Alkalien gelöst. Auch von Ammoniak werden sie aufgenommen und kristallisieren aus diesem im freien Zustande aus. Sie bilden mit Schwermetallen unlösliche Salze, von denen die mit dreiwertiger Basis im Überschuß löslich, die mit zweiwertiger in der Regel unlöslich sind. Beispielsweise sind die Kupfersalze so unlöslich, daß sie selbst bei längerem Kochen mit Wasser keine blauen Flüssigkeiten geben. Gleich den gewöhnlichen Diaminosäuren liefern sie beständige Chlorhydrate; verschieden von diesen werden die unlöslichen Silber- und Quecksilberverbindungen durch Alkali zerlegt. Den gewöhnlichen Monoaminosäuren ähneln sie darin, daß sie weder schwerlösliche Pikrate noch Chloroplatinate liefern. Den gewöhnlichen Diaminosäuren nähern sie sich dadurch, daß sie aus saurer Lösung durch Phosphorwolframsäure fällbar sind; allerdings lösen sich die Phosphorwolframate im Überschuß des Fällungsmittels wieder auf.

Bei Einwirkung von salpetriger Säure tauschen die Substanzen — wie in der Regel alle aliphatischen Amide — die Amidgruppe gegen Hydroxyl aus, es entstehen Dioxysäuren, die in Form ihrer schwerlöslichen Baryumsalze isoliert werden können. So erhielt ich aus Diaminosebacinsäure die Dioxysebacinsäure:



Mit Phenylisocyanat vereinigen sich die Diaminodicarbonsäuren zu schwerlöslichen schön kristallisierenden Hydantoin-säuren, die keine Neigung haben, in die entsprechende Phenylhydantoine überzugehen.

Besonders wichtig erschien im Hinblick auf das natürliche Vorkommen solcher Säuren und E. Fischers Esterverfahren zur Isolierung der Eiweißspaltungsprodukte das Verhalten dieser Säuren bei der Veresterung. Merkwürdigerweise zeigten hierbei Diaminokorksäure und Diaminosebacinsäure Unterschiede.

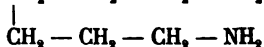
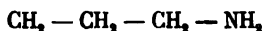
Die Sebacinsäure weist ganz den Charakter von Monoaminosäuren auf, indem sie sich in typischer Weise mit Äthylalkohol und Salzsäure verestern läßt.

Das salzsaure Salz des Diäthylesters ist eine schön kristallisierende Substanz. Durch Kaliumcarbonat und Kaliumhydroxyd wird aus der konzentrierten wässerigen Lösung des letzteren der Ester als ein dickes, gelbes Öl in Freiheit gesetzt, das auf der Carbonatlösung schwimmt und ausgeprägten Basengeruch besitzt; der Ester ist in Äther, namentlich in alkoholhaltigem, gut löslich und destilliert bei ca. 10 mm Druck gegen 250° als farbloses intensiv nach Piperidin riechendes Liquidum von stark basischem Charakter. Im Gegensatz zur freien Diaminosebacinsäure bildet der Ester mit Pikrinsäure ein schön kristallisierendes Salz.

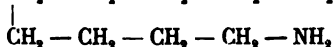
Da die Diaminosebacinsäure sich bei der Veresterung genau wie die Monoaminosäure verhält, so war es uns auffallend, daß Skraup seine in diese Gruppe gehörenden Säuren aus Casein und Gelatine nach Veresterung der hydrolytischen Spaltungsprodukte in dem nicht esterifizierten Anteil zusammen mit den gewöhnlichen Diaminosäuren gefunden hat. Versuche über die Veresterung der Diaminokorksäure lehrten jedoch, wie aus scheinbar geringfügigen Abweichungen ein ganz verändertes Verhalten bei der Behandlung mit Alkohol und Chlorwasserstoff resultiert. Während die mit der zehnfachen Menge absoluten Alkohols übergossene Diaminosebacinsäure beim Einleiten von getrocknetem Chlorwasserstoffgas schon in der Kälte schnell in Lösung geht, wird die niedriger homologe Diaminokorksäure bei gleicher Behandlung selbst in der

Siedehitze kaum gelöst, und auch bei lange fortgesetztem Einleiten von gasförmigem Chlorwasserstoff entsteht allein das Chlorhydrat der freien Diaminokorksäure. Ob dieses abweichende Verhalten nur mit der Unlöslichkeit des Chlorhydrates in Alkohol oder auch mit dem niedrigeren Molekulargewicht zusammenhängt, muß dahingestellt bleiben.

Bezüglich anderer Eigenschaften verhalten sich beide Säuren wiederum sehr ähnlich. Beide Körper besitzen keinen eigentlichen Schmelzpunkt, sondern sublimieren unter bestimmten Bedingungen, aber nicht unzersetzt, indem sie bei der Destillation unter Kohlensäureabspaltung Diamine ergeben. So entsteht aus der Diaminokorksäure das 1,6 Diaminohexan oder Hexamethylendiamin:



und analog aus der Diaminosebacinsäure das 1,8 Diaminooctan oder Octomethylendiamin:



(s. folg. Mitteil.).

Beim schnellen Überhitzen entwickeln beide Diaminodicarbonsäuren fichtenspanrötende Dämpfe, geben also analog allen Aminosäuren die Pyrrolreaktion.

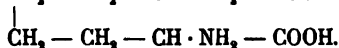
Hervorgehoben sei noch, daß auffallenderweise beide Säuren nicht im geringsten süß, sondern fade schmecken, obgleich sie sicher α -Aminosäuren sind und zweimal die dulcigene Gruppe $-\text{CHNH}_2 \cdot \text{COOH}$ enthalten.

Experimentelles.

(Mitarbeitet von Ernst Neimann).

A.

Diaminokorksäure.



Als Ausgangsmaterial diente α, α_1 -Dibromkorksäure, die nach der Vorschrift von Baeyer und Liebig¹⁾ dargestellt

¹⁾ Berichte, Bd. XXXI, S. 2106 (1898).

wurde, und zwar wurde die Korksäure in Portionen von 50 g mit 100 g Phosphortribromid und 180 g Brom 10 Stunden auf dem Wasserbade erwärmt und nach Vorschrift gereinigt. Der Schmelzpunkt des Präparates lag bei 170 bis 172,5°.

Die Dibromsäure wurde in Mengen von 30 bis 50 g mit der 20fachen Menge konzentrierten Ammoniaks (25%) und 30, resp. 50 g festen Ammoniumcarbonates im eisernen Digestor 6 Stunden lang auf 120° erhitzt, wobei der Druck auf zirka 12 Atmosphären stieg. Das Reaktionsprodukt enthielt die Diaminokorksäure in Form eines dicken, schwach gelblichen Schlammes, der abgesaugt und mit kaltem Wasser ausgewaschen wurde. Die gesamten Mutterlaugen wurden, um den in überschüssigem Ammoniak gelösten Anteil zu gewinnen, bis zur Entfernung des Ammoniaks resp. Ammoniumcarbonats stark eingedampft, wobei weitere Mengen der Diaminosäuren auskristallisierten. Nach 48stündigem Stehen wurde der Rückstand mit kaltem Wasser angerührt, abgesaugt und bis zur Halogenfreiheit ausgewaschen. Die so erhaltene Portion wurde mit der ersten vereint.

Beide stellen schon fast reine Diaminokorksäure dar. Durch Umkristallisation aus siedendem Ammoniak gewinnt man sie völlig rein. Dabei ist jedoch zu bemerken, daß wegen der großen Schwerlöslichkeit der Diaminosäure zirka das fünfzigfache Gewicht Ammoniak zur Lösung notwendig ist, und daß bei Arbeiten in Porzellangefäßen diese Säure ebenso wie die Diaminosebacinsäure Neigung hat, Kieselsäure und Aluminiumhydroxyd aufzunehmen, sodaß zur Analyse bestimmte Präparate in Platingefäßen umgelöst werden müssen. Die Ausbeute an reiner Säure betrug 30%.

Die Substanz kristallisiert in glitzernden Nadelchen, die unter dem Mikroskop sternförmig gruppiert erscheinen, sie hat keinerlei Geschmack, besitzt keinen Schmelzpunkt, sondern zersetzt sich langsam beim Erhitzen über 300°; dabei sublimiert unter Nebelbildung ein Teil, aus dem Hexamethyldiamin isoliert werden konnte (siehe S. 113). Beim Überhitzen treten fichtenspannrötende Dämpfe auf.

Analyse:

0,2265 g Substanz ergaben 0,3864 g CO₂ und 0,1640 g H₂O

0,2357 „ „ „ 25,4 ccm N (17°, 755 mm)

C₈H₁₆O₄N₂. Berechnet: C 47,05%, H 7,84%

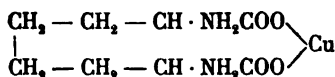
Gefunden: C 46,53%, H 8,05%

Berechnet: N 12,06%

Gefunden: N 12,43%.

In Alkalien wie in Mineralsäuren ist die Diaminokorksäure unter Salzbildung leicht löslich. Kristallisiert wurde z. B. das Chlorhydrat erhalten (s. S. 103). Beim Kochen der in Wasser suspendierten Substanz mit Kupferkarbonat erhält man keine blaue Lösung, wohl aber sieht man, daß an die Stelle des grünen anorganischen Kupfersalzes eine neue mattblaue Verbindung tritt. Um zu dem reinen Kupfersalz zu gelangen, habe ich folgenden Weg eingeschlagen, der sich auch für die Darstellung der anderen Salze als der zweckmäßigste erwiesen hat.

Diaminokorksaures Kupfer.



1,05 g Diaminokorksäure (etwas mehr als ein Molekül) wurden mit 10 ccm $\frac{n}{1}$ -Natronlauge versetzt, mit 20 ccm Wasser verdünnt, umgeschüttelt, aufgekocht und dann vom ungelösten abfiltriert. Zu dieser Lösung, die das stark dissoziierte Natriumsalz enthielt, wurde dann Kupfersulfat bis zur sauren Reaktion hinzugegeben, wobei sich sofort das normale Kupfersalz als blaßblaue, in Wasser total unlösliche Kristallmasse abschied. Dasselbe wurde abgesaugt und gründlich mit Wasser ausgewaschen und ist dann vollkommen rein.

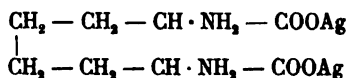
Analyse:

0,2044 g Substanz ergaben nach dem Verglühen 0,0561 g CuO

C₈H₁₄O₄N₂Cu. Berechnet: Cu 21,76%

Gefunden: „ 21,96%.

Diaminokorksaures Silber.



Auf ganz analogem Wege wurde die Silberverbindung erhalten, indem zur Lösung des Natriumsalzes Silbernitrat im

Überschuß zugefügt wurde. Das Silbersalz fällt als weiße, im Wasser gänzlich unlösliche Masse aus, die abgesaugt, mit Alkohol und Äther ausgewaschen und im Vacuum getrocknet wird. Es bildet dann ein weißes Pulver, dessen Zusammensetzung genau der des normalen Silbersalzes entspricht.

Analyse:

0,1795 g Substanz ergaben nach dem Glühen 0,0873 g Ag

$C_8A_{14}O_4N_4Ag_2$. Berechnet: Ag 48,43%

Gefunden: > 48,64%.

Von überschüssigem Alkali wird die Silberverbindung zersetzt, z. B. wird durch Barytwasser Silberoxyd abgespalten.

Auf gleiche Weise lassen sich die anderen Salze der Diaminokorksäure gewinnen. Die mit dreiwertigem Metall sind im Überschuß des Fällungsmittels in der Regel löslich, die mit zweiwertigem unlöslich bis auf die von Blei, Mangan und Nickel.

Das Natriumsalz gibt mit

Aluminiumsulfat einen weißen, gelatinösen Niederschlag;

Chromalaun eine blaugrüne Fällung, die flockig ist und sich größtenteils im Überschuß löst;

Ferrichlorid einen bräunlichen Niederschlag;

Ferrosulfat einen grünlichen Niederschlag, unlöslich im Überschuß des Fällungsmittels;

Cadmiumsulfat eine weiße, flockige Fällung, die beim Erwärmen pulverig wird;

Quecksilberchlorid einen weißen, schweren Niederschlag.

Ebenso verhält sich neutrales, nicht aber saures

Quecksilbersulfat, letzteres fällt nicht;

Quecksilberacetat, weißer, flockiger Niederschlag, der beim Erhitzen pulverig wird;

Nickelsulfat, eine der Kupferverbindung ähnliche blauweiße Fällung, die sich im Überschuß mit grünlicher Farbe löst;

Manganosulfat, weißer, gelatinöser Niederschlag, löslich im Überschuß;

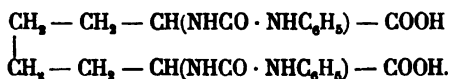
Bleizucker und Bleiessig, weiße, im Überschuß lösliche Niederschläge.

Das Verhalten der Diaminokorksäure zu den Alkaloidreagentien ist folgendes:

Phosphorwolframsäure erzeugt in der mit Salz- oder Schwefelsäure angesäuerten Lösung einen Niederschlag, der sich im Überschuß des Fällungsmittels löst.

Pikrinsäure, Tannin, Platinchlorid, Goldchlorwasserstoffsäure, Kaliumwismut- und Kaliumquecksilberjodid fallen nicht.

Phenylcyanatverbindung der Diaminokorksäure.



Gleich den gewöhnlichen Aminosäuren tritt Diaminokorksäure mit Phenylisocyanat in Reaktion unter Bildung eines normalen Harnstoffderivates.

2 g Diaminokorksäure wurden in 20 ccm n_{11} -Natronlauge gelöst, mit 20 ccm Wasser verdünnt und unter Kühlung mit ca. 2,6 g Phenylcyanat geschüttelt. Nachdem der stechende Geruch des letzteren verschwunden war, wurde vom nebenbei gebildeten Diphenylharnstoff abfiltriert, und die alkalische Lösung mit Salzsäure versetzt; dabei schied sich sofort das Phenylcyanatadditionsprodukt als feste weiße Kristallmasse ab, die abgesaugt und mit kaltem Wasser ausgewaschen wurde. Zur Reinigung wurde dieselbe aus verdünntem Alkohol umkristallisiert, wobei sie in schneeweißen Nadelchen vom Schmelzpunkt 250° erhalten wurde.

Analyse:

0,1773 g Substanz ergaben 19,2 ccm N (19° , 765 mm)

Berechnet: N 12,66 %

Gefunden: N 12,53 %.

Versuch zur Veresterung der Diaminokorksäure.

Wie im theoretischen Teil auseinandergesetzt wurde, läßt sich die Diaminokorksäure nicht auf die gewöhnliche Weise mit Äthylalkohol und Salzsäuregas verestern. Der Versuch wurde so unternommen, daß 5 g freie Diaminokorksäure mit 50 ccm absolutem Alkohol übergossen und dann mit Chlorwasserstoffgas gesättigt wurden. Weder in der Kälte noch beim darauf folgenden Erwärmen am Rückflußkühler für sich oder bei gleich-

zeitigem Einleiten von Salzsäuregas erfolgte Lösung. Es blieb vielmehr eine weiße Kristallmasse zurück, die schließlich abgesaugt und mit Alkohol und dann mit Äther ausgewaschen wurde. Sie löste sich leicht in Wasser, war aber nicht das Chlorhydrat des erwarteten Diäthylesters, sondern das beständige salzsaure Salz der Diaminokorksäure selbst. Die Analyse ergab, daß hier das Dichlorhydrat vorliegt.

Analyse:

Titration:

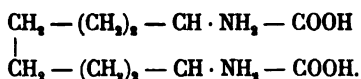
Für 0,1784 g Substanz wurden verbraucht: 12,85 ccm $\frac{n}{10}$ -AgNO₃,

C₈H₁₆O₄N₂Cl₂. Berechnet: Cl 25,63%

Gefunden: Cl 25,57%.

B.

Diaminosebacinsäure.



Zur Darstellung der Diaminosebacinsäure ging ich von der bekannten α - α ,1-Dibromsebacinsäure aus, die nach der Vorschrift von Auwers und Bernhardt¹⁾ durch Einwirkung von Brom und rotem Phosphor auf Sebacinsäure erhalten wird; es wurden 60 g Sebacinsäure stets auf einmal verarbeitet, indem sie nach inniger Mischung mit 7 g rotem Phosphor und 250 g Brom in bekannter Weise behandelt wurden. Statt des für derartige Bromierungen vielfach üblichen komplizierten Apparates diente ein einfacher Rundkolben mit eingeschliffenem breiten Kühlrohr A, über welches der Mantel eines Liebig'schen Kühlers gezogen war. Durch dieses Kühlrohr hindurch führte ein zweites dünneres B eines gewöhnlichen Kühlers, das mit seinem erweiterten Ansatz in dem oberen freien Ende von B hing und einige Zentimeter über dem Boden des Kolbens endigte. Dieses Kühlrohr B, durch das successive das Brom eintropfte, wurde nach beendeter Bromzugabe aus dem Kühlrohr A herausgezogen. Nach dem Verschuß von A mit einem Chlorcalciumrohr wurde das Bromierungsgemisch dann fünfzehn Stunden auf dem Wasserbade erhitzt. Die weitere Verarbeitung geschah nach

¹⁾ Berichte, Bd. XXIV, S. 2232 (1891).

Vorschrift, und die erhaltene Dibromsebacinsäure wurde aus heißem Wasser umkristallisiert, bis sie den Schmelzpunkt 118° zeigte.

Zur Verwandlung in die Diaminosäure wurde das erhaltene Produkt mit der gleichen Menge gepulverten festen Ammoniumcarbonates und der zwanzigfachen Menge konzentrierten Ammoniaks (25%) 6 Stunden lang im eisernen Autoklaven auf 120° erhitzt. 30—50 g Dibromsebacinsäure können so auf einmal verarbeitet werden. Der Autoklaveninhalt enthält bereits den größten Teil der Diaminosäure in fester Form suspendiert, doch wurde zunächst durch Eindampfen in flacher Schale auf dem Wasserbade der Ammoniaküberschuß entfernt. Dabei kristallisiert vom Rande her in reichlicher Menge die Diaminosäure in farblosen Krusten. Nach 24 stündigem Stehen wird sie abfiltriert und kann wegen ihrer großen Schwerlöslichkeit im Wasser leicht durch Auswaschen von Bromammonium befreit werden. Es hinterbleibt ein weißes Kristallpulver, das nur durch Spuren von Eisenoxyd und andere mechanische Beimengungen verunreinigt ist. Durch Kristallisation aus sehr viel heißem 25%igen Ammoniak erhält man die Diaminosäure in fettig glänzenden Schuppen in einer Ausbeute von 72%. Die Substanz teilt die Neigung ihres niederen Homologen, der Diaminokorksäure, aus Porzellangefäßen Kieselsäure und Tonerde aufzunehmen. Deshalb wurde der zur Analyse bestimmte Anteil noch einmal im Plattingefäß umgelöst.

Analyse:

0,1964 g Substanz ergaben 0,3691 g CO_2 und 0,1532 g H_2O

0,2357 „ „ „ 25,4 ccm (17° , 755 mm)

$\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4$. Berechnet: C 51,72%, H 8,62%

Gefunden: C 51,25%, H 8,67%

Berechnet: N 12,06%

Gefunden: N 12,43%.

Unter dem Mikroskop erweisen sich die fettig glänzenden Schuppen als ein Konglomerat feiner Nadelchen, die gleich den meisten höheren Diaminosäuren, ohne zu schmelzen, sich über 300° langsam zersetzen. Hierbei sublimiert ein Teil unter Bildung von kohlensaurem Octomethyldiamin. Bei schnellem Erhitzen liefert die Substanz fichtenspanrötende Dämpfe.

Auch diese Diaminosäure schmeckt, obgleich sie eine α - α_1 -Säure ist, nicht süß, sondern fade.

Die Verbindung löst sich leicht in Mineralsäuren wie in flüchtigen und fixen Alkalien. Beim Kochen mit letzteren gibt sie kein Ammoniak ab, sondern ist beständig. Die Schwermetallsalze sind außerordentlich wenig löslich und können deshalb nicht durch Kochen der Diaminosäuren mit den entsprechenden Metalloxyden oder Carbonaten dargestellt werden, wohl aber durch doppelte Umsetzung der leicht löslichen Alkaliverbindungen.

Diaminosebacinsaures Kupfer.

0,52 g Diaminosebacinsäure wurden mit 5 ccm $n/1$ Natronlauge und 10 ccm Wasser erwärmt und vom Ungelösten abfiltriert. Zur erkalteten Lösung wurde Kupfersulfat im Überschuß gegeben, wobei sofort in himmelblauen Nadeln das diaminosebacinsaure Kupfer ausfiel. Es wurde abgesaugt und successive mit Wasser, Alkohol und Äther ausgewaschen; es ist selbst in siedendem Wasser total unlöslich.

Analyse:

0,2044 g Substanz ergaben nach dem Verglühen 0,0561 g CuO

$C_{10}H_{16}O_4N_2Cu$. Berechnet: Cu 21,76%

Gefunden: > 21,96%

Diaminosebacinsaures Silber.

Die Verbindung wird auf analogem Wege aus 0,52 g Diaminosäure, Lauge und konzentriertem Silbernitrat erhalten; sie stellt ein weißes allem Anschein nach amorphes Pulver dar, das in Wasser völlig unlöslich ist, sich aber in Salpetersäure wie in Ammoniak löst. Die Verbindung wird abgesaugt und bildet nach dem Auswaschen mit Alkohol und Äther ein farbloses Pulver, das sich im direkten Licht langsam bräunt. Fixe Alkalien scheiden sofort Silberoxyd aus.

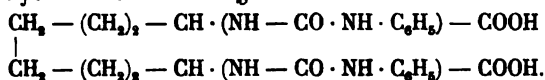
Analyse:

0,1795 g Substanz ergaben nach dem Glühen 0,0873 g Ag

$C_{10}H_{16}O_4N_2Ag_2$. Berechnet: Ag 48,43%

Gefunden: > 48,64%

Phenylcyanatverbindung der Diaminosebacinsäure.



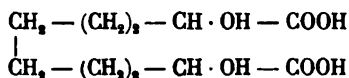
1,2 g Diaminosebacinsäure wurden in 10 ccm $\frac{n}{1}$ -Natronlauge gelöst, mit 20 ccm Wasser verdünnt und mit 1,6 g Phenylcyanat in bekannter Weise behandelt. Nach 2stündigem Stehen wurde filtriert und mit Salzsäure das Additionsprodukt ausgefällt. Letzteres bildet ein weißes Kristallpulver, das abgesaugt und mit kaltem Wasser ausgewaschen wurde. Die Verbindung, die in quantitativer Ausbeute entsteht, ist sofort rein und zeigt den Schmelzpunkt 210° , der sich bei Umkristallisation aus heißem, 50%igem Alkohol nicht ändert.

Analyse:

0,2195 g Substanz ergaben 22,4 ccm N (21° , 767 mm)

Berechnet: N 11,91%

Gefunden: N 11,73%

Verwandlung der Diaminosebacinsäure in α - α_1 -Dioxysebacinsäure.

0,5 g Diaminosebacinsäure wurden in der berechneten Menge (2 Moleküle) verdünnter Schwefelsäure gelöst; hierzu wurde tropfenweise unter Turbinieren und gleichzeitiger Kühlung eine Lösung der doppelten theoretischen Quantität Baryumnitrit gefügt. Es beginnt eine regelmäßige Gasentwicklung, bei der zuerst reiner Stickstoff, zum Schluß auch Stickoxyde entweichen. Nach eintägigem Stehen wurde Salzsäure bis zur deutlich sauren Reaktion hinzugefügt und aufgekocht, wobei abermals Gasentwicklung zu konstatieren war. Neben Baryumchlorid enthält die vom BaSO_4 abfiltrierte Lösung nunmehr die Dioxysebacinsäure.

Zu deren Isolierung wird mit Ammoniak übersättigt und auf dem Wasserbade bis auf ein kleines Volumen eingeeengt. Dabei scheidet sich das dioxysebacinsäure Baryum¹⁾ als

¹⁾ Die Existenz dieser Verbindung erwähnt A. v. Baeyer (Ber., Bd. XXX, S. 1962 [1897]); über ihre Zusammensetzung findet sich keine Angabe in der Literatur.

körnige, sandige Masse ab, die zur Reinigung noch einmal in verdünnter Salzsäure gelöst und durch Neutralisation mit Ammoniak und darauf folgendem Eindampfen wiedergewonnen wird. Nach dem Waschen mit Wasser, Alkohol und Äther ist die Verbindung rein; sie wurde bei 125° zur Gewichtskonstanz getrocknet.

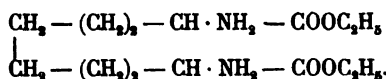
Analyse:

0,1740 g Substanz ergaben nach dem Veraschen und Abrauchen mit Schwefelsäure 0,1088 g BaSO₄.

C₁₀H₁₆O₆Ba. Berechnet: Ba 37,13%

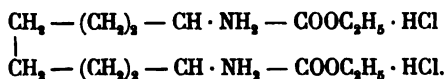
Gefunden: > 36,80%.

Diaminosebacinsäurediäthylester.



Wie zuvor bemerkt ist, läßt sich die Diaminosebacinsäure, ungleich der Diaminokorksäure, aber ganz analog den gewöhnlichen Monoaminosäuren durch Behandlung mit Salzsäuregas und absolutem Alkohol in den normalen Ester verwandeln. Zur Ausführung des Versuches wurden 5 g mit 50 ccm absoluten Alkohols übergossen und ohne besondere Kühlung mit trockenem Salzsäuregas gesättigt. Dabei ging schon in kurzer Zeit die Diaminosäure in Lösung. Nachdem die alkalische Flüssigkeit gesättigt war, wurde sie zur Vervollständigung der Reaktion noch am Rückflußkühler auf dem Wasserbade eine Viertelstunde erwärmt. Der erhaltene

Salzsaure Diaminosebacinsäurediäthylester



wird im festen Zustande am sichersten durch Verdunstung der salzsauren Flüssigkeit im Vacuumexsikkator über konzentrierter Schwefelsäure und Calciumoxyd gewonnen. Er hinterbleibt dann als aus langgestreckten Nadelchen bestehende farblose Kristallmasse, die abgepreßt wird und ohne weiteres rein ist.

Analyse:

0,2235 g Substanz ergaben 15,1 ccm N (19°, 751 mm)
 Für 0,1898 „ „ wurden verbraucht 10,9 ccm $\frac{1}{10}$ -AgNO₃
 $C_{14}H_{20}O_4N_2Cl_2$. Berechnet: N 7,75%, Cl 19,67%
 Gefunden: N 7,67%, Cl 19,24%.

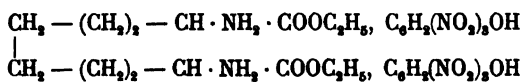
Das Chlorhydrat löst sich leicht in Alkohol, aber nicht in Äther. Destilliert man die überschüssige alkoholische Salzsäure aus der Lösung des Diäthylesters auf dem Wasserbade ab, so findet eine geringe Zersetzung statt, die Flüssigkeit verfärbt sich, und der Ester hinterbleibt als gelbbraunliche, halb feste, halb flüssige Masse, sei es, daß hierbei partielle Verseifung oder Kondensation stattfindet.

Aus dem salzsauren Salz läßt sich

der freie Ester

in der üblichen Weise gewinnen. Die konzentrierte Lösung in Wasser wird mit festem Kaliumcarbonat und etwas KOH im Überschuß versetzt, worauf sich dicke gelbliche Öltropfen mit intensiv piperidinähnlichem Geruch an die Oberfläche heben. Dieselben lassen sich mit Äther, leichter aber mit einem solchen, der 10% Alkohol enthält, ausschütteln. Nach der Trocknung über Glaubersalz wird dieser Auszug verdunstet und im Vacuum rektifiziert. Bei 240° und ca. 10 mm Druck destilliert der freie Ester als farbloses Liquidum, dem auch im reinen Zustande der erwähnte Geruch zukommt. Der freie Ester schwimmt zunächst auf Wasser, löst sich aber nach kurzer Zeit darin auf. Von Alkohol wird er leicht, von Äther etwas schwerer aufgenommen. In Benzol und Ligroin ist er unlöslich. Gleich den Estern aller Aminosäuren besitzt auch der Diaminosebacinsäurediäthylester ausgeprägt basischen Charakter. Er reagiert intensiv alkalisch auf Lakmus und vereinigt sich mit zwei Äquivalenten Säure zu gut kristallisierenden Salzen. Am leichtesten erhältlich ist

das Pikrat,



das auf Zusatz konzentriert wässriger Pikrinsäurelösung zur

wässrigen Lösung des Esters als Kristallbrei ausfällt. Es kann auch aus dem Chlorhydrat auf gleichem Wege erhalten werden.

Das Pikrat bildet schwefelgelbe Nadeln, die in Wasser außerordentlich schwer löslich und nach dem Auswaschen mit diesem Solvens sofort rein sind. Sie zersetzen sich bei 198°.

Analyse:

0,1529 g Substanz ergaben 0,2330 g CO₂ und 0,0636 g H₂O

C₂₆H₂₄O₁₈N₈. Berechnet: C 41,82%, H 4,56%

Gefunden: C 41,56%, H 4,62%.

Zur Kenntnis der Diamine.

II. Mitteilung.¹⁾

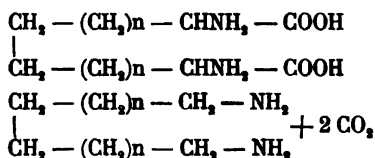
Eine neue Synthese der Diamine.

Von

Carl Neuberg.

(Aus dem chemischen Laboratorium des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)
(Der Redaktion zugegangen am 3. Mai 1906.)

Wie in der vorangehenden Mitteilung erwähnt ist, spalten die Diaminocarbonsäuren bei der trockenen Destillation Kohlensäure ab und geben Diamine:

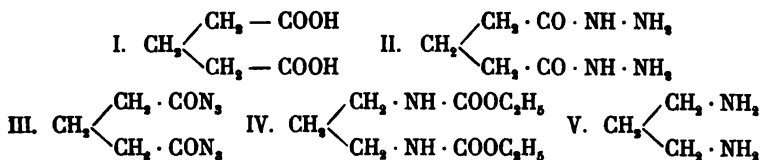


Diese Reaktion involviert ein neues Verfahren zur Synthese der Diamine, das namentlich im Hinblick auf physiologische Fragen nicht ohne Interesse ist. Die Abspaltung von Kohlensäure aus Aminosäuren ist ein gerade in letzter Zeit häufig beobachteter physiologischer Vorgang, und die Bildung der Diamine bei der Verdauung und der Ptomaine bei der Fäulnis ist auf diesem Wege wiederholt erklärt worden. Durch das rein chemische Experiment konnte jedoch diese Anschauung bisher nicht gestützt werden, indem auf rein chemischem Wege ohne Mitwirkung von Organismen oder Enzymen Kohlensäureabspaltung aus Diaminosäuren bisher nicht möglich war.

Zu den älteren Methoden der künstlichen Darstellung von Diaminen, den Verfahren von A. W. v. Hofmann, Ladenburg, Mendius, Gabriel, Tafel, Ciamician, hat vor

¹⁾ Die erste Mitteilung siehe Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 355 (1904).

wenigen Jahren Curtius ein neues gefügt, indem er seine Methode zum Ersatz einer Karboxylgruppe durch Amid auf die Dicarbonsäuren übertrug. Diese Methode, die von den Säurehydraciden (II) über die Acide (III) zu den Urethanen (IV) und schließlich den Aminen (V) führt, hat die Umwandlung z. B. der Glutarsäure (I) in 1,3 Diaminopropan ermöglicht:



Auf demselben Wege erhielt Curtius¹⁾ das 1,6-Diaminohexan aus dem Korksäurehydracid und das 1,8-Diaminooctan aus der entsprechenden Sebacinsäureverbindung. Diaminohexan und Diaminooctan entstehen nun durch einfache Abspaltung zweier Moleküle Kohlensäure, auch aus der Diaminokorksäure und Diaminosebacinsäure²⁾ d. h. es verhalten sich die Diaminodicarbonsäuren wie die Monoaminosäuren. Der Übergang der letzteren in gewöhnliche Amine, z. B. von Leucin in Amylamin ist schon seit langem bekannt.³⁾ Die chemische Abspaltung von Kohlensäure aus solchen Verbindungen der aliphatischen Reihe vollzieht sich nun nicht sehr glatt, indem nebenher auch pyrogene Produkte auftreten. Bei den erwähnten höher molekularen Diaminodicarbonsäuren bildet die Isolierung der daraus entstehenden Diamine jedoch nur geringe Schwierigkeiten, indem das Diamin resp. das kohlen saure Salz im Ansatzrohr des Destillationskolbens größtenteils erstarrt und durch Lösen mit Äthylalkohol sowie

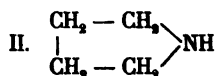
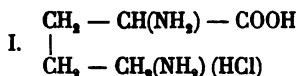
¹⁾ Journ. f. prakt. Chemie [2], Bd. LXII, S. 189 u. 212 (1900).

²⁾ Auch die Abspaltung von CO_2 aus den aromatischen Diaminosäuren, z. B. aus den verschiedenen Diaminobenzoessäuren, vollzieht sich außerordentlich leicht. So zerfällt ja die 1:2:4-Säure im Moment der Entstehung in CO_2 und m-Phenylendiamin (Wurster, Ber., Bd. VII, S. 149). Bei einer gemischt aromatisch-aliphatischen Phenyl-diaminosäure, bei der α -Anilido- β -Aminopropionsäure, hat S. Gabriel (Ber., Bd. XXXVIII, S. 645) CO_2 -Abspaltung bei Destillation mit Natronkalk beobachtet.

Abdampfen von dem nebenher gebildeten leicht flüchtigen Ammoniak getrennt werden kann.

Die Erfolge, die wir bei den zweibasischen Diaminosäuren hatte, veranlaßten uns, zu prüfen, ob nicht auch die gewöhnlichen Diaminosäuren zum Übergang in Diamine durch Abspaltung eines Moleküls Kohlensäure befähigt sind, zumal diese wegen ihrer größeren Beteiligung am Aufbau des Eiweißmoleküls für die physiologische Bildung der Diamine noch mehr in Betracht kommen. Jüngst haben A. Loewy und C. Neuberg¹⁾ gezeigt, daß Lysin (Diaminokapronsäure) und Ornithin (Diaminovaleriansäure) im Organismus des Cystinurikers unter Kohlensäureverlust in die entsprechenden Diamine übergehen und als die Quelle des bei dieser Stoffwechselanomalie auftretenden Tetramethyldiamins (Putrescin) und des Pentamethyldiamins (Cadaverin) aufzufassen sind. Daß auch Fäulniserreger die analoge Umwandlung von Lysin und Ornithin bewirken, hat schon früher A. Ellinger²⁾ gezeigt.

Den ersten Versuch, auch auf chemischem Wege Kohlensäure aus den einbasischen Diaminosäuren abzuspalten, scheint Drechsel³⁾ unternommen zu haben. Bei der trockenen Destillation von salzsaurem Lysin gelangte er jedoch zu keiner einheitlichen, definierbaren Verbindung; ähnliche Versuche haben E. Schulze und Winterstein⁴⁾ mit Ornithinchlorid angestellt. Bei der trockenen Destillation der salzsauren Diaminovaleriansäure (I) erhielten sie eine vermutlich als Pyrrolidin (II) anzusprechende Substanz:



gewannen sie jedoch nicht in reinem Zustand. Nun ist bekannt, daß die salzsauren Salze der Diamine bei der

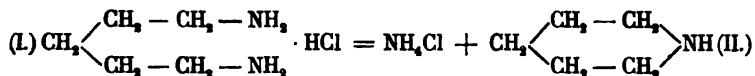
¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 338 (1904).

²⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXI, S. 3183 (1899), und Diese Zeitschrift, Bd. XXIX, S. 334 (1900).

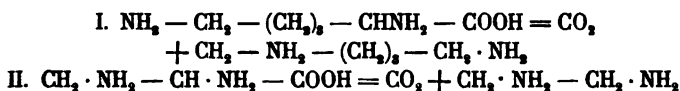
³⁾ Verhandl. d. Königl. Sächs. Akademie d. Wissensch., Bd. XXI, S. 117 (1889).

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXIV, S. 133 (1902).

trockenen Destillation unter Verlust von Chlorammonium in cyclische Amine¹⁾ übergehen, beispielsweise Pentamethylen-diaminchlorhydrat (I) in Piperidin (II):



Wenn also Schulzes und Wintersteins Reaktionsprodukt aus salzsaurer Diaminoveriansäure wirklich Pyrrolidin gewesen ist, so wird man die Bildung des letzteren wohl der Gegenwart von Chlorwasserstoff zuzuschreiben haben, der intermediär gebildetem Tetramethylen-diamin bei der hohen Temperatur die Elemente des Ammoniaks entzieht;²⁾ denn es gelingt, die freien Diaminosäuren durch Kohlensäureabspaltung bei der trockenen Destillation direkt in Diamine zu verwandeln, und zwar sind die Versuche mit Lysin (I) und mit α - β -Diaminopropionsäure (II) ausgeführt, welche Cadaverin und Äthylendiamin ergaben:



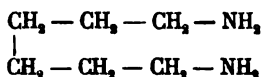
Diamine können also sowohl aus den Diaminomonowie Diaminodicarbonsäuren durch Abspaltung von ein oder zwei Molekülen Kohlensäure erhalten werden.

Experimentelles.

(Mitbearbeitet von Ernst Neimann.)

A.

Übergang von α - α , β -Diaminokorksäure in 1,6-Hexamethylen-diamin.



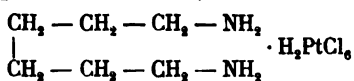
Für die Abspaltung von Kohlensäure aus der Diaminokorksäure und der homologen Diaminosebacinsäure hat sich folgendes Verfahren als das zweckmäßigste erwiesen.

¹⁾ A. Ladenburg, Ber., Bd. XVIII, S. 3100 (1885).

²⁾ A. Ladenburg, Ber., Bd. XX, S. 442 (1887).

1 bis 3 g der freien Diaminosäure wurden in vollkommen trockenem Zustande aus einem kleinen Fraktionierkölbchen mit niedrigem Ansatzrohr der trockenen Destillation unterworfen, wobei das Destillat in einem zweiten Kölbchen aufgefangen wurde, das mit dem ersten nach Art der zur Vacuumdestillation dienenden Apparatur verbunden war. Eine besondere Kühlung ist dabei nicht nötig, indem die entweichenden Dämpfe nichts von dem gesuchten Reaktionsprodukt fortführen. Letzteres sublimiert zum Teil in Form eines weißen Beschlages, zum Teil destilliert es als im Kühlrohr mehr oder minder vollständig erstarrendes gelbes Öl, während verkohlte Massen im Kolben zurückbleiben. Der sublimierte wie destillierte Anteil werden gemeinsam durch Auskochen mit Alkohol gelöst, filtriert und auf dem Wasserbade verdunstet. Es hinterbleibt eine halb kristallinische, halb amorphe Masse, die unter anderem das Diamin enthält. Der Rückstand wird mit Wasser angerührt und schwach erwärmt; ungelöst hinterbleiben braune Öltropfen pyrogener Zersetzungsprodukte, die durch ein nasses Filter abfiltriert werden. In der dunkel gefärbten Lösung befindet sich das Diamin resp. sein Kohlensaures Salz, das mit Knochenkohle entfärbt und in die folgenden, es charakterisierenden Verbindungen verwandelt wurde.

Chloroplatinat des 1,6-Diaminohexans.



Die konzentrierte wässrige Diaminlösung wurde mit etwas Alkohol und dann mit Platinchlorid im Überschuß versetzt. Sofort begann die Ausscheidung der Platindoppelverbindung, die nach 24stündigem Stehen abgesaugt und mit Alkohol und Äther ausgewaschen wurde. Sie bildet ein orangegelbes Kristallpulver, dessen Reinheit durch die Analyse bestätigt wurde.

Analyse:

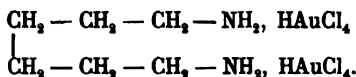
0,1611 g Substanz ergaben 6,9 ccm N (17°, 748 mm)

0,1557 „ „ „ 0,0568 g Pt

$\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_4\text{Cl}_6\text{Pt}$. Berechnet: N 5,35%, Pt 36,90%

Gefunden: „ 4,89%, „ 36,48%

Chloraurat des 1,6-Hexamethyldiamins.



Die Verbindung wurde in derselben Weise durch überschüssige Goldchlorwasserstoffsäure gefällt. Ihre Abscheidung beginnt gleichfalls sofort; sie bildet ein gelbbraunes Kristallpulver, das nach dem Auswaschen mit Alkohol und Äther im Vacuum über Phosphorpentoxyd bis zur Gewichtskonstanz getrocknet wurde. Unter dem Mikroskop erkennt man, daß die Substanz aus glänzenden, prismatischen Kristallen besteht.

Analyse:

0,0939 g Substanz ergaben 0,0465 g Au

$\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2\text{Cl}_2\text{Au}_2$. Berechnet: Au 49,50%

Gefunden: > 49,52%

Quecksilberchloriddoppelsalz des Diaminohexans.

Zur Darstellung dieser Verbindung diente nicht die Lösung der freien Base, sondern das Chlorhydrat. Letzteres wurde durch Neutralisation der alkalisch reagierenden Diaminohexanlösung mit Salzsäure und Abdampfen auf dem Wasserbade bereitet. Der Rückstand wurde in etwa 50%igem Alkohol gelöst, filtriert und mit gesättigter wässriger Sublimatlösung versetzt. Sofort fiel ein weißer mikrokristallinischer Niederschlag aus, der abgesaugt und mit Wasser, Alkohol und Äther ausgewaschen wurde. Beim Trocknen im Vacuumexsikkator über Phosphorpentoxyd wird die Verbindung gewichtskonstant und nimmt einen leicht gelblichen Farbenton an.

Analyse:

0,1505 g Substanz ergaben 0,0974 g HgS

Gefunden: Hg 55,78%

Die Analyse führt zu der Zusammensetzung



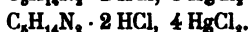
für das Doppelsalz. Diese Formel verlangt Hg = 54,95%.

Nun haben Curtius und Clemm¹⁾ eine Quecksilberverbindung der Zusammensetzung $\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2 \cdot 2\text{HCl} \cdot 4\text{HgCl}_2$ erhalten.

¹⁾ Journal f. prakt. Chemie, Bd. LXII, S. 208, 1900.

Die Bedingungen, unter denen diese Autoren gearbeitet haben, sind etwas andere gewesen als bei uns, indem sie die Fällung in rein wässriger Lösung und mit der freien Base, nicht mit ihrem Chlorhydrat vornahmen.

Aus den Untersuchungen von L. Brieger,¹⁾ A. Ladenburg,²⁾ Werigo³⁾ und Bocklisch⁴⁾ über die Mercurichloride der anderen Diamine, z. B. des Pentamethyldiamins, ist bekannt, daß diese Substanzen je nach Konzentration und Wahl des Lösungsmittels verschieden zusammengesetzte Doppelsalze mit Sublimat bilden können; z. B. sind die folgenden Cadaverinverbindungen bekannt:



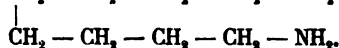
Die Existenz zweier verschieden zusammengesetzter Hexamethyldiamin-Quecksilberverbindungen ist demnach nicht auffallend.

Die freie Base, resp. ihr Carbonat geben ferner Niederschläge mit Phosphorwolframsäure, Gerbsäure und Kaliumwismutjodid. Mit Pikrinsäure erhielten wir in der Verdünnung nur eine ölige Trübung.

Die Ausbeute an Diaminohexan entspricht 28% der Theorie, berechnet auf die angewandte Menge Diaminokorksäure.

B.

Übergang von α - α ,₁-Diaminosebacinsäure in 1,8-Octomethyldiamin.



Durch trockene Destillation von Diaminosebacinsäure in Mengen von 1—3 g entsteht unter analogen Verhältnissen und unter gleichen Erscheinungen wie beim Diaminohexan das

¹⁾ Untersuchungen über Ptomaine, Berlin 1886.

²⁾ Ber. der Deutsch. chem. Ges., Bd. XIX, S. 2586 (1886), und Bd. XX, S. 2217 (1887).

³⁾ Pflügers Archiv, Bd. LI, S. 363 (1891).

⁴⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XX, S. 1442 (1887).

Diaminooctan. Die Isolierung geschah in der gleichen Weise und lieferte ebenfalls eine alkalisch reagierende Lösung des freien Diamins, resp. seines Carbonates. Die Base gibt selbst in starker Verdünnung Niederschläge mit:

Phosphorwolframsäure, in saurer Lösung dichte weiße Fällung;

Tannin, einen flockigen Niederschlag;

Platinchlorid, gelbe kristallinische Fällung;

Quecksilberchlorid, eine weiße Fällung;

Neßlers Reagens, desgleichen;

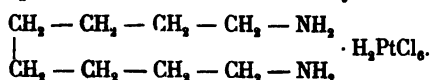
Kaliumwismutjodid, einen bräunlichen Niederschlag;

Goldchlorid, in der Verdünnung nur eine Trübung;

Pikrinsäure, desgleichen.

Analysiert wurden das Platinsalz und die Quecksilberverbindung.

Chloroplatinat des Octomethyldiamins.



Die Verbindung entsteht wie die entsprechende des Diaminohexans und bildet ein gelbes Kristallpulver, das mit Alkohol und Äther gewaschen und im Vacuumexsikkator zur Gewichtskonstanz getrocknet wird.

Analyse:

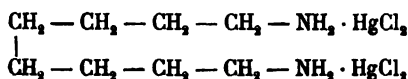
0,1345 g Substanz ergaben 5,5 ccm N (15°, 770 mm)

0,1214 „ „ „ 0,0434 g Pt

$\text{C}_8\text{H}_{22}\text{N}_2\text{Cl}_6\text{Pt}$. Berechnet: N 5,08%, Pt 35,20%

Gefunden: „ 4,85%, „ 35,75%.

Quecksilberchloriddoppelverbindung des Diaminooctans.



Zur Darstellung derselben wurde die Substanz in konzentrierter wässrig-alkoholischer Lösung mit gesättigter Subli-

matlösung ausgefällt. Die Zusammensetzung der Verbindung stimmt am besten mit der Formel $C_8H_{20}N_2 \cdot Hg_2Cl_4$ überein. Curtius und Steller¹⁾ haben ein Diaminooktanderivat der Formel $C_8H_{20}N_2 \cdot 2 HCl \cdot 4 HgCl_2$ beobachtet; bezüglich der Existenz verschiedener Typen der Quecksilberdoppelsalze sei auf das beim Diaminohexam Gesagte verwiesen.

Diese Verbindung bleibt auch bei der Trocknung im Vacuum farblos, während Curtius für seine anders zusammengesetzte rosa Färbung angibt.

Analyse:

0,1187 g Substanz ergaben 0,0786 g HgS

$C_8H_{20}N_2Cl_4Hg_2$. Berechnet: Hg 57,20 %

Gefunden: > 57,17 %

22,5 % der angewandten Diaminosebacinsäure lassen sich auf diese Weise in Diaminooctan überführen.

C.

Verwandlung des Lysins in Pentamethyldiamin.

Zur Ausführung des Versuches diente als Ausgangsmaterial das Pikrat des natürlichen optisch-aktiven Lysins. Dasselbe wurde in konzentrierter wässriger Lösung mit der doppelten Menge der theoretisch erforderlichen Quantität Schwefelsäure in das Sulfat verwandelt, die Pikrinsäure durch Filtration und der Rest durch Extraktion mit Äther entfernt. Durch Zusatz der berechneten Menge Barytwasser wurde sodann die Schwefelsäure genau entfernt und eine Lösung des freien Lysins erhalten, dessen Menge 8,22 g betrug. Dieselbe wurde in einem kleinen Destillationskölbchen in vacuo abgedampft und der Rückstand nach der Trocknung bei 120° direkt der Destillation unterworfen. Hierbei geht das Lysin resp. das nach dem Abdampfen wohl zurückbleibende kohlen saure Additionsprodukt, das lysincarbaminsäure Lysin von Drechsel und Krüger,²⁾ zum Teil in Pentamethyldiamin über. Neben intensiv nach Pyrrol riechenden Dämpfen destillieren Wassertropfen und ein auf ihnen schwimmendes braunes

¹⁾ Journal für prakt. Chemie, Bd. LXII, S. 230 (1900).

²⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXV, S. 2454 (1892).

Öl über. Wegen der größeren Flüchtigkeit des Diaminopentans war die Vorlage mit verdünnter Salzsäure gefüllt und von außen gekühlt. Sobald weder Dämpfe noch Öltropfen im Ansatzrohr mehr sichtbar waren, wurde das aus zwei Schichten bestehende Destillat sofort verarbeitet. Die Ölschicht blieb bei wiederholter Filtration durch nasse Filter auf diesem zurück, während das Diamin in der salzsauren Lösung sich befand. Letztere wurde mit Knochenkohle entfärbt und dann auf dem Wasserbade bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde mehrfach mit siedendem Alkohol ausgezogen, wobei Chlorammonium und auch kleine Mengen organischer Verbindungen zurückblicken. Der in Lösung befindliche Anteil wurde durch Eindampfen gewonnen, wobei eine zerfließliche Masse resultierte. Dieselbe wurde in Wasser gelöst, mit Natronlauge alkalisch gemacht und nach dem jüngst von Loewy und Neuberg¹⁾ angegebenen Verfahren zur Isolierung der Diamine in das Phenylcyanatderivat verwandelt. Dem Gewicht des zerfließlichen Chlorhydrates entsprechend (2,08 g) wurden 3 g Phenylcyanat angewendet. Es resultiert ein verhältnismäßig reichlicher Niederschlag, der aus einem Gemisch von Diphenylharnstoff und der Biphenylcyanatverbindung des Pentamethyldiamins bestand. Letztere wurde in der von Loewy und Neuberg angegebenen Weise zunächst durch Auskochen mit Alkohol und dann durch Kristallisation aus siedendem Pyridin rein erhalten, und zwar in einer Menge von 2,02 g.

Analyse des Phenylcyanatderivates:

0,1864 g Substanz ergaben 26,1 ccm N (18°, 754 mm)
0,1816 " " " 0,4485 g CO₂ und 0,1161 g H₂O
C₁₅H₂₂N₄O₂. Berechnet: N 16,47%, C 67,06%, H 7,06%
Gefunden: " 16,05%, " 67,36%, " 7,10%.

Auf diese Weise läßt sich also auf rein chemischem Wege Lysin in Pentamethyldiamin überführen, und zwar entspricht dessen Menge, berechnet aus der isolierten Phenylcyanatverbindung, einer Ausbeute von 7,6%.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 355 (1904).

D.

Überführung von α - β -Diaminopropionsäure in Äthylendiamin.

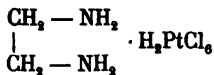
Als Ausgangsmaterial diente reine, nach Neuberg und Silbermann¹⁾ dargestellte Diaminopropionsäure, die durch Schütteln mit einem kleinen Überschuß von Silberoxyd vom Halogen und durch Behandlung mit Schwefelwasserstoff vom gelösten Silber befreit wurde. Die bei Verarbeitung von 12,6 g Chlorhydrat resultierende Lösung der freien Diaminopropionsäure, resp. ihres Kohlensäureadditionsproduktes wurde eingeeengt und in der beim Lysin beschriebenen Weise aus einem Fraktionierkolben in eine mit Salzsäure beschickte Vorlage hineindestilliert. Die Reaktion vollzog sich in ähnlicher Weise, nur entstanden weniger ölige Produkte, aber mehr Chlorammonium als beim Lysin. Durch Ausziehen mit warmem absoluten Alkohol wurde auch hier das salzsaure Diamin vom Chlorammonium befreit und schließlich aus wässriger Lösung mit Platinchlorid gefällt. Die Analyse bestätigte das Vorliegen des Äthylendiamins.

Äthylendiaminchloroplatinat.

Analyse:

0,1641 g Substanz ergaben 8,7 mm N (17°, 759 mm)

0,1281 „ „ „ 0,0529 g Pt



Berechnet: N 5,96%, Pt 41,48%

Gefunden: „ 6,15%, „ 41,30%

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVII, S. 342 (1904).

Über die Harnsäurebildung und die Harnsäurezersetzung in den Auszügen der Rinderorgane.

**Ein weiterer Beitrag zur Kenntnis der Fermente des Nuclein-
stoffwechsels.**

Von

Alfred Schittenhelm.

(Aus dem Laboratorium der medizinischen Klinik zu Göttingen: Geheimrat Ebstein.)
(Der Redaktion zugegangen am 10. Mai 1906.)

In früheren Mitteilungen¹⁾ konnte ich zeigen, daß aus Rindermilz ein isolierbares Ferment gewonnen werden kann, welches ohne Sauerstoffzufuhr im Thermostaten die Umwandlung von Guanin in Xanthin bewirkt, bei ständiger Sauerstoffzufuhr aber an Stelle des Xanthins Harnsäure liefert, sodaß hierdurch der Beweis erbracht ist, daß der Weg der Harnsäurebildung aus Guanin über das Xanthin führt. Meine weiteren Untersuchungen zeigten dann, daß bei diesem Vorgang offenbar zwei verschiedene Fermente tätig sind, ein hydrolytisch wirkendes, das die NH_2 -Gruppe ablöst, und welches sich einer ausgedehnten Verbreitung im Tierkörper erfreut, und ein oxydierendes Ferment, dessen Existenz auf bestimmte Organe beschränkt zu sein scheint. Zum Teil vorgreifend auf nachstehend mitgeteilte Versuche teilte ich mit, daß das hydrolysierende Ferment in Leber, Lunge, Muskel, Milz, Thymusdrüse und Niere zu finden ist, während die Oxydase nur in der Milz, Leber, Lunge und dem Muskel existiert. Daneben nahm ich in der Milz noch ein weiteres Ferment an, welches die α -Thymonucleinsäure zu spalten vermag. Auch Nucleoproteide werden in allen diesen Organen aufgespalten, was ohne weiteres

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 251 und Bd. XLIII, S. 228.

mit Sicherheit daraus hervorgeht, daß in den Leerversuchen aus den eigensten Nucleoproteiden resp. deren Purinbasen Harnsäure gebildet wird. In Gemeinschaft mit Bendix¹⁾ gelang ferner die Übertragung der Versuche auf den lebenden Organismus. Nach intravenöser Applikation von Guanin konnten wir beim Kaninchen feststellen, daß dasselbe in Harnsäure übergeführt wird, wobei als Zwischenprodukt Xanthin entsteht.

Im Anschluß an die bekannten Untersuchungen Horbaczewskis haben bereits Spitzer²⁾ und Wiener³⁾ gefunden, daß die wässerigen Extrakte der Rinderleber und -Milz bei Sauerstoffzufuhr imstande sind, die Oxypurine (Xanthin und Hypoxanthin) in Harnsäure überzuführen. Spitzer zeigte, daß diese Umsetzung nahezu quantitativ verläuft; in gleicher Weise machte er bereits Versuche mit Aminopurinen (Adenin und Guanin), bei denen ebenfalls eine Harnsäurebildung vor sich ging, ohne daß jedoch, wie bei den Oxypurinen, ein quantitativer Verlauf hätte gefunden werden können. In Verfolgung dieser Versuche konnte ich⁴⁾ mit Hilfe einer kleinen Änderung der Versuchsanordnung, die darauf beruhte, daß ich die Aminopurine in natronalkalischer Lösung anstatt in saurer zugab, den Nachweis erbringen, daß auch die Aminopurine quantitativ in Harnsäure übergehen, bei Verwendung von Extrakten der Milz und der Lunge. Vorgreifend auf nachstehende Versuche teilte ich des ferneren mit, daß auch Leber und Muskel die Umsetzung bewirken, daß dieselben jedoch gleichzeitig eine Harnsäure zerstörende Wirkung entfalten.

Eine sehr erfreuliche Übereinstimmung mit diesen Resultaten brachten die jüngst erschienenen, schönen Arbeiten Burians.⁵⁾ Er konnte aus Rinderleber auf dem Wege eines Chloroformwasserauszuges ein sehr wirksames Extrakt gewinnen, welches eine Oxydase enthielt, die, bei Gegenwart von Sauerstoff, Xanthin und Hypoxanthin rasch

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 365.

²⁾ Arch. f. Physiol., 1899, Bd. LXXVI, S. 192.

³⁾ Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmak., 1899, Bd. XLII, S. 373.

⁴⁾ l. c.

⁵⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 497 u. 532.

in Harnsäure überzuführen vermag. Er zeigte ferner, daß der Verlust an Purinbasenstickstoff größer war, als der Zuwachs an Harnsäurestickstoff, was auf die Fähigkeit des Leberauszuges zurückzuführen ist, Harnsäure in geringer Menge zu zerstören. Ganz ähnliche Verhältnisse finden sich nach Burians weiteren Untersuchungen in den Muskeln, in welchen er ebenfalls in Übereinstimmung mit mir eine Harnsäurebildung und -Zerstörung, nebeneinander hergehend, annimmt. Durchblutungsversuche am überlebenden Muskel führten ihn zu der bemerkenswerten Entdeckung, daß während der Arbeit im Muskel eine beständige Bildung von Hypoxanthin statthat, welches sofort in Harnsäure umgesetzt wird und als solche wenigstens teilweise der weiteren Zerstörung umgehend anheimfällt.

Während aber Burians und meine Untersuchungen in bester Harmonie sich bestätigen und ergänzen, kann das nicht mehr gesagt werden von den Arbeiten W. Jones¹⁾ in Gemeinschaft mit Partridge und Winternitz. Schon früher betonte ich, daß ich mich mit Jones und Partridge insofern in Widerspruch setze, als meine Untersuchungen unzweideutig ergeben, daß in der Milz ein Ferment existiert, welches Guanin in Xanthin überführt, während jene annehmen, daß eine Bildung von Xanthin aus Guanin wohl in der Thymusdrüse, dem Pankreas und der Nebenniere, nicht aber in der Milz vorkomme. Jones hat in Gemeinschaft mit Winternitz soeben eine weitere Mitteilung als Fortsetzung diesbezüglicher Versuche erscheinen lassen. Er kommt darin zu dem Resultat, daß in der Milz sowohl wie in der Leber sich ein Ferment finde, welches Adenin in Hypoxanthin umzuwandeln vermag, während eine analoge Umwandlung des Guanins in Xanthin sich nicht erweisen lasse. Es müsse also der Abbau von Adenin durch ein anderes Ferment verursacht werden, wie der von Guanin, und demnach eine «Adenase» und eine «Guanase», also zwei voneinander verschiedene Fermente, angenommen werden. Daneben finde sich noch eine Oxydase, welche Hypoxanthin in Xanthin um-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 343, u. Bd. XLIV, S. 1.

zuwandeln vermöge. Diese Annahme von Jones und seinen Mitarbeitern von der Verschiedenartigkeit der «Guanase» und «Adenase» stimmt jedoch nicht, wie sich schon aus den nachstehend verzeichneten Untersuchungen, die mit meinen früheren im Einklang stehen, ergibt. Da jedoch der Entscheidung unserer Untersuchungsdifferenzen eine prinzipielle Bedeutung beizumessen ist, so habe ich eingehendere Untersuchungen über die Ursachen derselben angestellt, welche ich in der folgenden Abhandlung gesondert mitteile.

Ich habe inzwischen meine Untersuchungen in alter Weise weitergeführt und auf die verschiedensten Organe ausgedehnt. Dabei machte ich bald die Beobachtung, daß bei gewissen Organen eine bedeutend geringere Menge Harnsäure wiedergefunden wurde, als der verschwundenen Quantität jeweils zugesetzter Purinbasen entsprochen wäre. Im Hinblick auf die schon von früheren Autoren beobachtete Harnsäurezerstörung¹⁾ im tierischen Organismus legte dieser auffallende Befund von vornherein die Annahme nahe, daß der Grund dafür eine weitere Zersetzung der neugebildeten Harnsäure hätte. Genauere Untersuchungen ergaben die Richtigkeit dieser Annahme, und ich habe darüber vorgreifend schon in meiner letzten Mitteilung kurz berichtet. Inzwischen sind nun von Burian²⁾ eingehende Untersuchungen mitgeteilt worden, in welchen eine Harnsäurezerstörung in Leber und Muskel des Rindes sicher festgestellt werden konnte. Meine Resultate stimmen, wie in allen anderen Punkten, auch in diesem mit Burians vorzüglich überein, was mir um so wertvoller zu sein scheint, als wir beide gleichzeitig und vollkommen unabhängig von einander zu ganz denselben Schlüssen kamen. Auf die Details meiner Feststellungen gehe ich bei den einzelnen Organen genauer ein.³⁾

¹⁾ Jakoby, Virch. Arch., Bd. CLVII, S. 261; Wiener, Arch. für experim. Pathol. u. Pharm., Bd. XLII, S. 357; Ascoli, Pflügers Archiv, Bd. LXXII, S. 340; Burian und Schur, Pflügers Archiv, Bd. LXXXVII, S. 306—318 etc.

²⁾ R. Burian, l. c., S. 506 und 543.

³⁾ Über die Isolierung des die Harnsäure zerstörenden Fermentes siehe die folgende Mitteilung «Über das uricolytische Ferment».

Der besseren Übersicht halber behandle ich im folgenden jedes einzelne Organ für sich allein.

Milz.

In erster Linie beschäftigte ich mich wieder mit Milz-extrakt und den daraus isolierbaren Fermenten. Nachdem zunächst ein Versuch, mittels der Rosellschen Uranylacetat-fällung eine brauchbare purinbasenfreie Fermentlösung zu erhalten, was wegen der einfachen und schnellen Durchführung dieser Methode große Vorzüge gehabt hätte, fehlgeschlagen war, bediente ich mich fernerhin stets der früher angegebenen Gewinnung durch Versetzen des Extraktes mit einer gesättigten Ammonsulfatlösung bis zu einem Sättigungsgrade von 66%. Es zeigte sich dabei, daß man schlechte oder gar nicht wirksame Lösungen erzielt, wenn man die Milz nur mit geringen Mengen Wasser auszieht oder den Preßsaft zu der Fällung verwendet. Am zweckmäßigsten hat sich stets die ursprüngliche Angabe gezeigt, wonach man die Pulpa von 1—2 Milzen (ca. 500—800 g) mit etwa 2—2 $\frac{1}{2}$ Litern Wasser unter Chloroformzusatz 1—2 Stunden mit dem automatischen Rührer durcharbeitet, und dann einen halben Tag kühl oder bei Zimmertemperatur stehen läßt. Dieser so erhaltene wässerige Auszug ist stets gut wirksam, und bei der weiteren Isolierung erzielt man auch meist gut wirksame Fermentlösungen. Ich möchte nicht unterlassen, darauf hinzuweisen, daß die Überlegenheit der wässerigen Auszüge vor den Preßsäften auch bei der Darstellung anderer Fermentlösungen, wie z. B. von Morawitz¹⁾ bei der Thrombokinasen beobachtet wurde. Den durch die Ammonsulfatfällung erzeugten Niederschlag filtriere ich spätestens nach 2—3 Stunden ab, suspendiere ihn je nach seiner Menge in 600—1000 ccm Wasser und schüttle die Suspension mit etwas Chloroform einige Zeit durch. Dann muß sie bis zur Ammoniakfreiheit dialysiert werden, was meist 10—14 Tage erfordert. Achtet man nicht gut darauf und ent-

¹⁾ Hofmeisters Beiträge, 1904, Bd. IV, S. 381.
Arch. f. klin. Mediz., 1904, Bd. LXXIX.

hält die gebrauchsfertige Fermentlösung noch mehr oder weniger große Mengen Ammonsulfat, so stört dasselbe sehr wesentlich deren Brauchbarkeit und kann sogar eine völlige Unwirksamkeit zur Folge haben. Ich verzichte darauf, hierfür Beispiele anzuführen, deren ich einige zu meinem Mißvergnügen erfahren habe. Schließlich wird filtriert und das Filtrat zu den weiteren Versuchen benützt.

Die Fermentlösung verliert bei längerem Stehen an Wirksamkeit.

Versuch I. Eine durch Ammonsulfatfällung gewonnene Milzfermentlösung, deren gute Wirksamkeit erwiesen war, blieb im Laboratorium über zwei Monate bei Chloroformzusatz stehen. Nunmehr wurden 300 ccm mit 0,3 g Guanin, in möglichst wenig Normalnatronlauge gelöst, in der gewöhnlichen Weise 3 Tage lang im Wasserbad bei ca. 40° unter Luftdurchleitung digeriert. Es konnten nur 0,08 g Harnsäure isoliert werden, während das Filtrat derselben eine dicke Silberfällung ergab.

Aus dem Versuch geht klar hervor, daß die Haltbarkeit der Fermentlösung eine äußerst begrenzte ist, und ich habe daher in der Folge zu den Versuchen nur frisch bereitete Lösungen benutzt.

Versuche, das Ferment in wirksamer Form als trockenes Pulver zu gewinnen, schlugen leider fehl. Es wurden stets durchaus wirkungslose Endprodukte erhalten, einerlei, ob die Fermentlösung bei entsprechender niedriger Temperatur im Vacuum oder ohne Anwendung desselben eingedunstet wurde.

Um nochmals zu erweisen, daß in der Milz die Fermente tatsächlich so vorkommen, wie ich sie in meiner letzten Mitteilung beschrieben habe, setzte ich nochmals Versuche mit Adenin¹⁾ an; daß Guanin umgesetzt wird, ist nochmals durch

¹⁾ Das Adenin stellte ich mir selbst aus Thymusdrüse als Pikrat dar; aus diesem habe ich nach Entfernung der Pikrinsäure die Base als Sulfat gewonnen und dieselbe daraus durch Ammoniak in Freiheit gesetzt. Das verwandte Guanin ist ein Mercksches Präparat. Vor Anstellung der Versuche überzeugte ich mich von der Reinheit der beiden Körper durch eine Stickstoffanalyse und durch Überführung in ihre charakteristischen Verbindungen.

die in der folgenden Mitteilung aufgeführten Untersuchungen festgestellt.

Versuchsreihe II.

Leerversuch:

a) 400 ccm Milzextrakt gehen 3 Tage lang bei ca. 40° unter ständiger Luftdurchleitung.¹⁾

Erhalten **0,11 g Harnsäure.**

b) 400 ccm Milzextrakt mit **0,3 g** in wenig Normalnatronlauge gelösten Adenins analog angesetzt.

Erhalten **0,33 g Harnsäure.**

0,1254 g Substanz verbrauchten 29,71 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalsalzsäure

Verlangt: 33,33% N; gefunden: 33,25% N.

Demnach sind **62,2%** des zugegebenen Adenins als Harnsäure wiedergefunden. Im Filtrat gab eine Silberfällung nur noch einen ganz geringen Niederschlag. Ich hatte also offenbar bei der Isolierung ziemlich große Verluste, so daß sich das Resultat in Wirklichkeit wohl weit besser stellte.

c) Isoliertes Milzferment (durch Aussalzen mit Ammonsulfat gewonnen) 300 ccm + **0,15 g** in wenig Normalsalzsäure gelösten Adenins analog angesetzt.

Erhalten **0,17 g Harnsäure.**

0,1028 g Substanz verbrauchten 24,45 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalsalzsäure

Gefunden: 33,29% N.

Es waren demnach **91,4%** des zugesetzten Adenins als Harnsäure wiedergefunden.

d) 800 ccm Milzextrakt + **0,8 g** in wenig Normalnatronlauge gelösten Adenins 3 Wochen lang gut verkorkt im Brutschrank. Für Sterilität war durch Zusatz von wenig Thymol in Substanz und von Chloroform gesorgt.

Nach Abbruch des Versuchs wurde die Reaktionsflüssigkeit mit Schwefelsäure ($1\frac{1}{2}\%$) 5 Stunden am Rückflußkühler

¹⁾ Der Luftstrom muß eine hinreichende Geschwindigkeit haben, da reichlich Sauerstoffzufuhr Vorbedingung zum Gelingen der Versuche ist. Zur Beseitigung des manchmal recht lästigen Schäumens genügt meist der Zusatz eines erbsengroßen Stückes niedrig schmelzenden Paraffins oder einiger Tropfen reinen Öls.

gekocht; danach wurde mit Natronlauge alkalisch gemacht und aus der Lösung im Kochen durch Ansäuern mit Essigsäure das Eiweiß ausgefällt, welches dann abfiltriert und zur möglichsten Vermeidung grober Verluste noch zweimal mit Natronlauge gelöst und mit Essigsäure wieder gefällt wurde. Aus den vereinigten Filtraten wurden die Basen als Kupferoxydulverbindungen isoliert. Nach Zersetzung mit Schwefelwasserstoff wurde das Filtrat zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in ca. 300 ccm verdünnten Ammoniaks aufgekocht und 12 Stunden in der Kälte stehen gelassen. Dabei fiel nichts aus; also kein Guanin vorhanden.

Die Lösung wurde mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt; die Silberverbindungen, nach Abfiltrieren und Auswaschen bis zur NH_3 -Freiheit, wurden durch HCl zerlegt und das Filtrat zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde mit Wasser einige Zeit digeriert und dann einige Stunden in der Kälte stehen gelassen.

Das Ungelöste löst sich alles glatt in verdünntem Ammoniak. Nach Abdampfen des NH_3 und Einengen kam Xanthin in typischer Form heraus.

Menge des gewonnenen Xanthins = 0,51 g.

Dasselbe wurde über das Nitrat, welches die bekannte Kristallform zeigte, gereinigt.

0,1092 g Substanz gaben 0,1587 g CO_2 und 0,0290 g H_2O

Berechnet für $\text{C}_8\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_2$:
39,47% C und 2,63% H.

Gefunden:
39,63% C und 2,95% H.

Aus dem Gelösten wurden 0,04 g Adeninipikrat isoliert. Sodann wurden 0,11 g Hypoxanthinipikrat gewonnen, welches die typische Kristallform (große tafelförmige Kristalle) zeigte.

Im Filtrat davon konnte noch eine geringe Menge Basen als Kupferoxydulverbindung gefällt werden, deren weitere Verarbeitung infolge eines Mißgeschicks vereitelt wurde.

Es waren also gefunden worden 0,51 g Xanthin, 0,11 g Hypoxanthinipikrat und 0,04 g Adeninipikrat.

e) Leerversuch: 800 ccm Milzextrakt, für dessen Darstellung versehentlich 10 Stunden in der Schüttelmaschine ge-

schüttelt wurde, wurden sofort mit Schwefelsäure ($1\frac{1}{2}\%$) 5 Stunden am Rückflußkühler gekocht.

Bei der weiteren Verarbeitung konnten isoliert werden:

0,15 g Harnsäure,
0,08 „ Guanin,
0,07 „ Adenin (als Pikrat).

Im Schlußfiltrat nur noch minimale Kupferfällung.

Durch alle diese Versuche und unter Hinzuziehung meiner früheren und der in der folgenden Mitteilung beschriebenen ist also einwandsfrei erwiesen, daß die Milz ein hydrolytisches Ferment besitzt, welches Guanin in Xanthin und Adenin in Hypoxanthin umwandelt, und zudem eine Oxydase, welche aus Hypoxanthin Xanthin und aus Xanthin Harnsäure zu bilden vermag.

Wie schon bemerkt, setze ich mich mit meinem Befund, daß die Milz imstande ist, Guanin in Xanthin umzusetzen, in Widerspruch zu Jones und seinen Mitarbeitern. Dagegen entspricht mein Befund im Adeninversuch ihren Resultaten. Jones und Winternitz¹⁾ zeigten, daß bei Zugabe von Adeninsulfat zu Milzinfus nach 9 tägiger Digestion im Thermostaten Xanthin als Endprodukt vorwiegt und nur noch relativ wenig Hypoxanthin gefunden wurde. Auch in meinem Versuch wird nach 3wöchiger Dauer vorwiegend Xanthin gefunden und es ist damit erwiesen, da die Menge des gefundenen Xanthins im Verhältnis zu der Quantität Harnsäure und Guanin des Leerversuchs viel zu groß ist, um dessen Entstehung auf die in dem Milzextrakt schon vorher vorhandene Basen zurückzuführen, daß der größere Teil des Xanthins seine Herkunft dem zugesetzten Adenin verdankt. Der Weg der Umsetzung geht offenbar mindestens zum größeren Teil über das Hypoxanthin, wofür die Auffindung des letzteren im Adeninversuch spricht. Es scheint also bei der Oxydation vom Hypoxanthin zu Xanthin keineswegs eine derart lebhaft Sauerstoffzufuhr vonnöten zu sein, wie bei der Oxydation von Xanthin zu Harnsäure. Immerhin bedarf der Versuch mit Adenin der Wiederholung, welche mir zur Zeit wegen Mangels an Adenin nicht möglich war.

¹⁾ l. c.

Der Umstand, daß eine quantitative Ausbeute an Harnsäure erzielt wurde, spricht schon klar gegen die Annahme einer weiteren Zersetzung der Harnsäure in der Milz. Daß diese in der Tat nicht statthat, zeigten mir speziell daraufhin durch Hinzufügen von gelöster Harnsäure zu Milzextrakt angestellte Untersuchungen.

Lunge.

Merkwürdigerweise hat mit diesem Organ bis jetzt noch niemand betreffs seiner Stellung zum Nucleinstoffwechsel experimentiert. Wie ich bereits in meiner ersten Mitteilung zeigen konnte, ist dasselbe analog der Milz imstande, die Purinbasen in Harnsäure umzusetzen. Auch was den Überführungsmodus anbelangt, liegen die Verhältnisse genau wie in der Milz, wie sich aus den folgenden Versuchen klar ergibt:

Versuchsreihe III.

a) 500 ccm Lungenextrakt¹⁾ 3 Tage lang bei 40° unter ständiger Sauerstoffzufuhr.

Erhalten 0,06 g Harnsäure.

Da der frische Lungenextrakt, wie ich mich leicht überzeugen konnte, keine freien, wohl aber gebundene Purinkörper enthält, so ist derselbe kraft seiner Fermente imstande, seine Nucleoproteide zu spalten und aus den frei gewordenen Purinbasen Harnsäure zu bilden.

b) 500 ccm Lungenextrakt + 0,2 g in wenig Normalnatronlauge gelösten Guanins analog angesetzt.

Erhalten 0,255 g Harnsäure.

0,1488 g Substanz verbrauchten 17,7 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalschwefelsäure
Gefunden: 33,31% N.

Es waren demnach 87,6% des zugesetzten Guanins als Harnsäure wiedergefunden.

¹⁾ Zur Herstellung des Lungenextrakts wurden 450 g Lungengewebe fein zerkhackt und mit Quarzsand zerrieben, sodann mit 3000 ccm Wasser und etwas Chloroform wie gewöhnlich weiter verarbeitet.

c) 500 ccm Lungenextrakt + 0,2 g in wenig NaOH gelösten Adenins analog verarbeitet.

Erhalten 0,25 g Harnsäure.

0,13 g Substanz verbrauchten 31,0 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalsalzsäure

Gefunden 33,38% N.

Mithin waren 76,3% des zugegebenen Adenins als Harnsäure wiedergefunden.

d) 800 ccm Lungenextrakt + 1 g in ca. 12 ccm Normalnatronlauge gelösten Guanins unter Chloroformzusatz 14 Tage lang im Thermostaten bei 37—38°.

Nach zweistündigem Kochen mit 16 ccm konzentrierter Schwefelsäure wurden die Basen als Kupferoxydulverbindungen nach der Methode Krüger und Schittenhelm isoliert. Nach Zersetzung mit Schwefelwasserstoff wird das Filtrat eingengt und dann, mit Ammoniak versetzt, 24 Stunden im Eisschrank stehen gelassen. Es fällt kein Guanin mehr aus.

Nach Abdampfen des Ammoniaks wird durch Stehenlassen der stark eingengten Lösung typisches Xanthin erhalten.

Menge = 0,65 g.

Das über das Nitrat gereinigte Präparat wird bei 140° getrocknet und der Analyse unterworfen.

0,1599 g Substanz gaben 0,2290 g CO₂ und 0,0407 g H₂O

Berechnet für C₅H₄N₄O₂:

39,47% C und 2,63% H.

Gefunden:

39,06% C und 2,83% H.

Es waren also bei diesem Versuch 64,4% des zugegebenen Guanins als Xanthin wiedergefunden.

e) 600 g Lungenextrakt + 0,5 g in wenig Normalnatronlauge gelösten Adenins unter Chloroformzusatz 14 Tage lang im Thermostaten bei 37—38°.

Nachdem das Gemisch mit 2 $\frac{1}{2}$ % iger Schwefelsäure 3 Stunden am Rückflußkühler gekocht hatte, wurden die Basen mit der Kupferfällung isoliert und, wie mehrfach beschrieben, weiter verarbeitet.

Es wurden isoliert (aus dem Ungelösten) 0,32 g Xanthin.

0,1335 g Substanz gaben 0,1937 g CO₂ und 0,0334 g H₂O.

Berechnet für C₅H₄N₄O₂:

39,47% C und 2,63% H.

Gefunden:

39,57% C und 2,77% H.

Im Filtrat vom Xanthinnitrat keine Silberfällung mehr.

Aus dem in Lösung Gegangenen wurden mit der Kupferfällung die Basen isoliert, die Kupferoxydulverbindungen mit H_2S zerlegt und das Filtrat salzsauer eingedampft. Der Rückstand (etwas über 0,3 g) wurde in ca. 50 ccm Wasser gelöst, von einigen Flocken abfiltriert und die Lösung heiß mit 0,5 g Pikrinsäure in Substanz versetzt. Beim Abkühlen fiel kein Adenin mehr aus. Dagegen kamen alsbald die schönen, tafelförmigen Kristalle des Hypoxanthin pikrats in makroskopisch erkennbarer Form heraus. Nach 12stündigem Stehen im Eisschrank wurden dieselben auf dem Filter gesammelt und mit kaltem Wasser gewaschen. Das Präparat wurde lufttrocken gewogen.

Die Menge des isolierten Hypoxanthin pikrats betrug 0,55 g.

Aus dem Filtrat konnten durch Einengen noch ca. 0,05 g Hypoxanthin pikrat isoliert werden.

Das Hypoxanthin pikrat wurde in ca. 60 ccm Wasser unter Zusatz von 2 ccm HNO_3 gelöst, die Lösung durch Ausschütteln mit Benzol von Pikrinsäure befreit, filtriert und stark eingengt. Dabei schied sich das Hypoxanthinnitrat in tadellosen wetzsteinförmigen Kristallen ab.

0,1775 g Substanz gaben 0,1328 g CO_2 und 0,0557 g H_2O

Berechnet für $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O} \cdot \text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}$:

Gefunden:

27,64% C und 3,22% H.

28,01% C und 3,48% H.

Es waren also in diesem Versuch an Stelle des zugesetzten Adenins gefunden worden: 0,32 g Xanthin und 0,213 g Hypoxanthin. Berechnet man die Menge beider Basen zusammen auf Adenin, so entspricht sie 0,495 g Adenin. Dabei ist allerdings noch in Rechnung zu ziehen, daß das Lungenextrakt an sich schon geringe Mengen von Basen enthält, welche jedoch, wie ein orientierender Versuch ergab, weniger als 0,1 g beträgt.¹⁾

Der Versuch steht in sehr guter Übereinstimmung mit den oben angeführten Adenin-Milzextraktversuchen (Versuchs-

¹⁾ In 600 ccm Lungenextrakt waren 0,039 g Basenstickstoff enthalten. Derselbe war also überaus basenarm.

reihe II, d), nur daß er, da die Isolierung der Basen glatt und ohne Störung vor sich ging, erheblich quantitativere Verhältnisse und damit auch eine klarere Übersicht über den Verlauf der Reaktion gibt. Das Adenin verschwindet total und findet sich in Form von Hypoxanthin und Xanthin wieder. Es wird also durch das hydrolytische Ferment in Hypoxanthin übergeführt und dieses wiederum durch die Oxydase zum Teil sofort zu Xanthin oxydiert. Es findet also dieselbe Umsetzung statt, wie sie inzwischen Jones und Winternitz für die Leber-, Milz- etc. Extrakte beschreiben.

Daß das Hypoxanthin zum Teil durch die Oxydase in Xanthin übergeführt wird, wahrscheinlich in dem Maße, als in der Versuchsflüssigkeit reaktionsfähiger Sauerstoff zur Verfügung steht, geht aus dem folgenden Versuch klar hervor. Dabei ist zu bemerken, daß auf diese Weise keine Harnsäure entsteht, welche jedoch sofort, wenn auch in relativ kleinen Mengen, gebildet wird, wenn durch häufiges Umschütteln die Flüssigkeit mit dem Sauerstoff der Luft in engere Beziehung gebracht wird.

f) 350 ccm Lungenextrakt + 0,5 g in wenig Normalnatronlauge gelösten Hypoxanthins wurden 10 Tage lang über Chloroform im Brutschrank gehalten.

Die Isolierung geschah wie gewöhnlich.

Es wurden 0,2 g Xanthin gefunden.

0,118 g Substanz verbrauchten 30,8 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalsalzsäure

Berechnet für $C_5H_4N_4O_2$:

36,84% N.

Gefunden:

36,54% N.

Aus dem Xanthinfiltrat konnten durch entsprechende Behandlung mit der berechneten Menge Pikrinsäure

0,76 g typisches Hypoxanthinpikrat isoliert werden. Dieselben gaben ins Nitrat verwandelt die verlangten Kristallformen.

Es waren also an Stelle der 0,5 g Hypoxanthin 0,2 g Xanthin und 0,27 g Hypoxanthin wiedergefunden worden.

Ebenso wie das Adenin unterliegt auch das Guanin der Einwirkung des hydrolytischen Fermentes und es entsteht Xanthin.

Endlich wird bewiesen, daß Adenin und Guanin quanti-

tativ in Harnsäure umgesetzt werden, wobei als Zwischenstufen Hypoxanthin und Xanthin auftreten.

Es kann also keinem Zweifel mehr unterliegen, daß die Lunge ganz dieselben Fermente enthält wie die Milz und damit dieselben Umsetzungen hervorzubringen vermag. Sie spielt also sicher eine nicht zu unterschätzende Rolle im Nucleinstoffwechsel.

Eine harnsäurezerstörende Tätigkeit liegt der Lunge in erheblicherem Maße, schon nach der Quantität der wiedergefundenen Harnsäure zu schließen, jedenfalls nicht ob. Versuche, bei welchen in Natronlauge gelöste Harnsäure frischem Lungenextrakt zugesetzt war, ergaben ebenfalls nach dieser Richtung ein negatives Resultat.

Leber.

Der Vollständigkeit halber teile ich auch einige Versuche über die Harnsäurebildung der Leber mit, obwohl dieselbe ja von allen, welche bisher darüber Versuche angestellt haben, anerkannt worden ist. Sodann beschäftigte ich mich mit den bei der Harnsäurebildung auftretenden Zwischenprodukten. Nachdem Jones und Winternitz erwiesen haben, daß Adenin durch die Fermente des Leberextraktes in Hypoxanthin umgesetzt wird, erübrigte sich für mich die Anstellung diesbezüglicher Versuche um so mehr, als diese Beobachtung im Einklang steht mit der von Spitzer und mir gefundenen Tatsache des Übergangs von Adenin in Harnsäure bei Gegenwart der Leberfermente. Anders aber steht es mit der Umwandlung des Guanins, die Jones und Winternitz für die Leber ebenso bestreiten, wie für die Milz. Da aber aus Guanin im Leberextrakt Harnsäure gebildet wird, so ergab sich von selbst die Notwendigkeit der Nachprüfung, welche dann auch zum Resultat hatte, daß bei zweckmäßiger Versuchsanordnung das Guanin ohne weiteres in Xanthin umgesetzt wurde. Auch hier finden sich also ein hydrolytisches und ein oxydierendes Ferment.

Der Umwandlungsprozeß macht aber nicht wie in der Lunge und Milz bei der Harnsäure Halt, sondern geht noch weiter, indem die neugebildete Harnsäure wenigstens zum Teil

zersetzt wird. Ich habe auf diesen Punkt schon in meiner letzten Mitteilung aufmerksam gemacht. Inzwischen sind von Burian unwiderlegliche Beweise dafür erbracht worden, welche in meinen folgenden Versuchsergebnissen eine absolute Bestätigung erhalten. Die Fähigkeit der Rinderleber, Harnsäure zu zerstören, ist also unzweifelhaft bewiesen und es steht diese Beobachtung im Einklang mit dem durch zahlreiche Autoren¹⁾ festgestellten Harnsäurezerstörungsvermögen der Hundeleber.

Versuchsreihe III.

a) 400 ccm Leberextrakt gehen 3 Tage bei 40° unter ständiger Luftzufuhr.

Erhalten 0,02 g Harnsäure.

Im Filtrat keine Silberfällung mehr.

b) 400 ccm Leberextrakt + 0,3 g in wenig Normalnatronlauge gelösten Guanins analog angesetzt.

Erhalten 0,141 g Harnsäure.

0,0869 g Substanz verbrauchten 20,55 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalsalzsäure
Gefunden: 33,11% N.

Im Filtrat der Harnsäure, welchem auch das zweite nach der Horbaczewskischen Umfällung erhaltene Filtrat zugegeben war, wurde eine Silberfällung vorgenommen und deren Stickstoffgehalt bestimmt.

Verbraucht wurden 16,7 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalsalzsäure.

Berechnet man die im Filtrat erhaltene Stickstoffmenge auf Guanin (= 0,054 g) und zählt die als Harnsäure wiedergefundene Menge (= 0,109 g) hinzu, so erhält man 0,163 g Guanin. Verloren gingen also 0,137 g resp. 45,7% des zugesetzten Guanins, mithin eine Menge, welche nicht aus den bei der Isolierung an sich unvermeidlichen Verlusten erklärt werden kann, da sie doch entschieden zu groß ist. Es lag daher sofort der Verdacht nahe, daß die neugebildete Harnsäure zum Teil wieder zerstört wird, um so mehr, als auch die in dem Leerversuch gefundene Menge im Hinblick auf die

¹⁾ Ausführliche Literaturangabe s. bei Burian, l. c. S. 506, und in der folgenden Mitteilung über das uricolytische Ferment.

in der angewandten Quantität Leberextrakt vorhandenen Nuclein-
substanzen eine auffallend niedrige war, namentlich auch im
Vergleich zu den mit Lunge- und Milzextrakt erhaltenen Werten.
Der Verdacht, daß es sich um eine Harnsäurezerstörung¹⁾ han-
delte, wurde durch folgenden Versuch zur Gewißheit.

c) 400 ccm Leberextrakt + 0,3 g in wenig Normal-
natronlauge gelöster Harnsäure analog angesetzt.

Gefunden: 0,122 g Harnsäure.

Im Filtrat wurde durch ammoniakalische Silberlösung kein
Niederschlag mehr hervorgerufen.

Es waren also 59% der zugesetzten Harnsäure zerstört
worden.

d) 400 ccm Leberextrakt + 0,2 g in wenig Normal-
natronlauge gelösten Adenins analog angesetzt.

Gefunden: 0,08 g Harnsäure.

Im Filtrat wurde eine Silberfällung gemacht, deren Stick-
stoffgehalt 46,2 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalsalzsäure entsprach. Auf Adenin
berechnet macht es 0,12 g Adenin. In diesem Versuch war
also offenbar die Fermentlösung keine sehr wirksame; vor
allem war die Harnsäurezerstörung sehr unbedeutend.

e) 800 g Leberextrakt + 1,0 g in Normalnatronlauge
gelösten Guanins werden unter Zusatz von Chloroform vom
15. XI. bis 1. XII. 04 im Thermostaten bei 37—38° verkorkt
belassen.

Wie gewöhnlich nach Aufschluß durch Kochen mit
Schwefelsäure verarbeitet. Es fand sich kein Guanin mehr.

¹⁾ Selbstverständlich wurden von allen diesen Versuchen mehr-
fache Kontrollversuche angestellt, welche alle ein übereinstimmendes
Resultat ergaben, wenn auch die jeweils erhaltenen Werte beträchtlich
voneinander abwichen, je nachdem in der angewandten Fermentlösung
das eine oder andere Ferment in größerer Wirksamkeit sich fand. —
Daß die beobachtete Harnsäurezerstörung nicht eine reine Alkaliwirkung
ist, das zeigen ja deutlich die zahlreichen Versuche mit Lunge, Milz etc.,
wo die Harnsäure ebenso quantitativ gefunden wurde, wie bei den eben-
falls angestellten Versuchen mit Harnsäure beschickter und analog be-
handelter Organextrakte, welche jedoch vorher einer Temperatur von
100° ausgesetzt worden waren.

Dagegen konnte 0,71 g Xanthin isoliert werden, welches, über das Nitrat gereinigt, zur Analyse kam.

0,1837 g Substanz gaben 0,2659 g CO_2 und 0,0487 g H_2O

Verlangt für $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_2$:

39,47% C und 2,63% H.

Gefunden:

39,48% C und 2,94% H.

f) 750 ccm Lebereextrakt + 1,0 g in ca. 12 ccm Normalnatronlauge gelösten Guanins vom 10. XII. 04 bis 20. I. 05 im Thermostaten.

Es wurde wiederum kein Guanin gefunden, wohl aber 0,75 g Xanthin.

Die Leber spielt also eine sehr wichtige Rolle im Purinstoffwechsel, indem sie, wie die Milz und die Lungen, aus zugeführten Purinbasen Harnsäure zu bilden vermag unter Einhaltung des für jene festgestellten Übergangsmodus. Dazu kommt aber als weitere wichtige Funktion die Harnsäurezerstörung.

Muskel.

Nach Burians eingehenden Versuchen erübrigt sich eigentlich, auf die Tätigkeit des Muskels näher einzugehen, da danach dessen Fähigkeit, Harnsäure zu bilden und zu zerstören, welche ja auch von mir bereits in meiner früheren Mitteilung betont wurde,¹⁾ absolut sicher festgestellt ist. Burian hat bekanntlich als neue Tatsache gefunden, daß im Muskel fortwährend eine Neubildung von Purinbasen vor sich geht; die neugebildeten Basen werden im ruhenden Muskel zu Harnsäure übergeführt, welche ihrerseits zum Teil sofort wieder zerstört wird; im arbeitenden Muskel verlassen sie zumeist unverändert denselben.

Meine Untersuchungen sollen nun das Verhalten des Muskelextraktes gegenüber zugeführten Purinbasen klarlegen und die Art deren Abbaus in demselben.

¹⁾ Auch Wiener (Arch. f. experim. Pathol. u. Pharm., Bd. XLII, S. 388) machte bereits Versuche über die harnsäurezerstörende Fähigkeit des Rindermuskels mit positivem Erfolge.

Versuchsreihe V.

a) 500 ccm Muskelextrakt gehen 3 Tage unter Chloroformzusatz bei ca. 40° unter ständiger Luftdurchleitung.

Gefunden: Spuren von Harnsäure.

Im Filtrat keine Basenfällung mehr.

b) 500 ccm Muskelextrakt + 0,2 g Harnsäure, in wenig Normalnatronlauge gelöst, ebenso angesetzt.

Wiedergefunden 0,09 g Harnsäure. N-Gehalt 33,31%.

Es waren demnach 55% der zugesetzten Harnsäure zerstört. Im Filtrat keine Silberfällung mehr.

c) 500 ccm Muskelextrakt + 0,2 g Guanin, in wenig Normalnatronlauge gelöst, ebenso angesetzt.

Gefunden: Spuren von Harnsäure.

Im Filtrat Silberfällung. Der Stickstoffgehalt der Basensilberverbindungen entsprach 8,9 ccm $\frac{1}{5}$ -Normalsalzsäure = 0,0249 g Basenstickstoff. Es entspricht derselbe 0,054 g Guanin.

Es waren also 73% des zugesetzten Guanins in Harnsäure umgesetzt und wieder zerstört worden.¹⁾

d) 800 ccm Muskelextrakt + 0,8 g in wenig Normalnatronlauge gelösten Guanins bleiben über Chloroform 14 Tage lang im Thermostaten bei 37—38° ohne Luftdurchleitung.

Hernach wird die Versuchsflüssigkeit mit Schwefelsäure (16 ccm) versetzt, 4 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Die mit der Kupferfällung gefällten und daraus wie gewöhnlich isolierten Basen werden in verdünntem Ammoniak in der Wärme digeriert, wobei sich alles löst. Nach 12stündigem Stehen im Eisschrank war nichts ausgefallen. Demnach war kein Guanin

mehr vorhanden.

¹⁾ Der Prozeß ging in Wirklichkeit noch viel intensiver vor sich, wenn man bedenkt, daß im Muskelextrakt an sich schon Basen vorhanden sind. Die Quantität derselben (gefunden nach Aufschluß durch 2% H_2SO_4 und zweimal wiederholte Fällung) betrug für den vorliegenden Fall 0,047 g Basenstickstoff in 500 ccm. Dieselben sind offenbar mit-umgesetzt worden. Auch beim Muskel unterliegt, wie mehrere Versuche ergaben, die Wirksamkeit der einzelnen Extrakte sehr großen Schwankungen. Manchmal scheint die Harnsäurebildung minimal zu sein.

Nach Abdampfen des Ammoniaks wird die Lösung salzsauer eingedampft. Der mehrmals mit Alkohol zur Vertreibung überschüssiger Salzsäure abgedampfte Rückstand wird mit ca. 200 ccm Wasser einige Zeit bei 50—60° digeriert und wiederum 12 Stunden in der Kälte stehen gelassen.

1. Ungelöstes in ca. 12 ccm Normalnatronlauge gelöst, mit Tierkohle entfärbt und heiß in 15 ccm kalter 50% iger Salpetersäure unter beständigem Umrühren einfiltriert. Nach längerem Stehen hatten sich

0,8 g Xanthinnitrat

in typischer Kristallform abgeschieden. In freies Xanthin verwandelt und bei 150° getrocknet, wurde folgende Analyse angestellt:

0,1203 g Substanz verbrauchten 31,4 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalsalzsäure

Berechnet: 36,84% N

Gefunden: 36,54% »

Im Filtrat nur noch geringe Silberfällung, bei deren Verarbeitung noch 0,055 g Xanthin gefunden wurde.

2. Gelöstes: Nochmals mit der Kupferfällung behandelt. Die gewonnenen salzsauren Basen ins Pikrat verwandelt. Dabei fand sich

kein Adenin.

Dagegen hatte sich nach 12stündigem Stehen eine Menge von 0,37 g Hypoxanthin-pikrat in typischer Kristallform abgeschieden. Ins Nitrat verwandelt erhielt ich die schönen wetzsteinartigen Kristalle des Hypoxanthinnitrats. Zur Elementaranalyse reichte das Material nicht aus; das Hypoxanthin ist jedoch durch die charakteristischen Kristallformen genügend gekennzeichnet.

Ich hatte demnach an Stelle der 0,8 g Guanin wiedergefunden 0,63 g Xanthin und 0,134 g Hypoxanthin.

Es ist also nicht zweifelhaft, daß im Muskel alle Fermente enthalten sind, wie in der Leber, und daß in demselben sowohl die Umwandlung der Aminopurine zu Oxy purinen und dieser zu Harnsäure vor sich geht, als auch eine Zerstörung der neugebildeten

Harnsäure.¹⁾ Auch dem Muskel kommt somit zweifellos eine große Rolle im Purinstoffwechsel zu.

Darm.

Meines Wissens ist der Darm zu derartigen Versuchen noch nie benutzt worden. Und doch scheint mir gerade die Stellung des Darmkanals gegenüber den Purinkörpern von weittragender Wichtigkeit zu sein, da doch vielleicht in ihm schon Umwandlungen der Nahrungspurine, vor ihrem Eintritt in Blut und Gewebe, vor sich gehen können. Wie eigentlich schon vorausszusehen war, ergaben denn auch meine Untersuchungen positive Resultate.

Ich will nicht unerwähnt lassen, daß mein erster Versuch, Darmextrakt auf die harnsäurebildende Fähigkeit hin zu untersuchen, ein negatives Resultat lieferte. Ich habe daher bei der Wiederholung des Versuches der Bereitung des Extraktes besondere Sorgfalt gewidmet.

Ich verwandte zu dessen Herstellung 2 kg Rinderdarm (Dünndarm), welche aufs peinlichste von anhaftenden Speisen und Kotresten gereinigt wurden. Sodann präparierte ich sorgfältig alles Fett und Mesenterium ab, wobei ich gleichzeitig den größten Teil der Darmserosa, welche sich leicht abziehen ließ, mit entfernte. Die auf diese Weise in reinstem Zustand erhaltene Darmwand wurde nunmehr fein zerkleinert, mit 2500 ccm Wasser und 15 ccm Chloroform zusammengebracht und zwei Stunden mit dem automatischen Rührer durchgearbeitet. Danach blieb das Ganze 20 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Dann wurde wie gewöhnlich koliert und filtriert.

Versuchsreihe VI.

a) Leerversuch: 400 ccm Darmextrakt gehen 3 Tage unter Chloroformzusatz bei ca. 40° unter ständiger Luftdurchleitung.

Danach war mit der Kupferfällung kein Niederschlag zu erhalten.

¹⁾ Vergl. dazu Burian, Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 539 und Wiener, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmak., Bd. XLII, S. 375.

b) 400 ccm Darmextrakt + 0,2 g Guanin, in wenig Normalnatronlauge gelöst, analog angesetzt.

Erhalten: 0,14 g Harnsäure. Stickstoffgehalt = 33,11%.

Im Filtrat Silberfällung. Der N-Gehalt der Basensilberverbindungen entsprach 18,5 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalsalzsäure = 0,026 g Basenstickstoff. Auf Guanin berechnet gibt derselbe 0,056 g Guanin.

Es waren also 63% des zugegebenen Guanins in Harnsäure umgesetzt worden.¹⁾ Eine Harnsäurezerstörung scheint nicht stattzuhaben.

c) 800 ccm Darmextrakt + 0,8 g Guanin, in ca. 10 ccm Normalnatronlauge gelöst, wurden mit Chloroform versetzt, 12 Tage lang im Thermostaten bei 37° aufbewahrt.

Das Gemisch wurde nunmehr mit Schwefelsäure versetzt, sodaß der Gehalt $2\frac{1}{2}$ % entsprach, und danach 3 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Die weitere Verarbeitung geschah wie gewöhnlich.

Es fand sich keine Spur von Guanin mehr.

Das Ammoniak wurde abgedampft und die Flüssigkeit auf ein kleines Volumen eingengt. Dabei schied sich Xanthin in großen Krusten ab.

Gesamtmenge des gewonnenen Xanthins = 0,8 g.

Im Filtrat war nur noch minimale Fällung mit ammoniakalischer Silberlösung.

Das Xanthin wurde zur Analyse in natronalkalischer Lösung mit Tierkohle entfärbt, ins Nitrat verwandelt und aus diesem, welches in typischen Kristallen zum Vorschein kam, mit Ammoniak frei gemacht. Das durch Einengen gewonnene Xanthin wurde, wie gewöhnlich, mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen und bei 140° getrocknet.

1. 0,1102 g Substanz verbrauchten 28,7 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalsalzsäure

2. 0,12 „ „ „ 31,5 „ „

Für $C_5H_4N_4O_2$ berechnet: 36,84% N

gefunden: 1. 36,47% „

2. 36,75% „

¹⁾ Bei einem zweiten analog angesetzten Versuch wurden 0,12 g Harnsäure gefunden.

Es fand sich somit in diesem Versuch das zugegebene Guanin nahezu quantitativ als Xanthin wieder.

Die Versuche haben also den Beweis dafür erbracht, daß der Darm sich in seinen Funktionen den Purinkörpern gegenüber sämtlichen bisher untersuchten Organen anschließt. Auch er enthält das hydrolytische Ferment, das aus Guanin Xanthin darstellt. Versuche mit Adenin konnten leider bisher wegen Mangels an diesem Körper nicht angestellt werden; in Analogie mit den andern Organen ist jedoch daran nicht zu zweifeln, daß auch das Adenin in Hypoxanthin übergeführt wird.

Der Darm enthält aber zudem die Oxydase und kann zweifellos Harnsäure bilden. Ich muß daher eine entgegengesetzte Angabe,¹⁾ welche ich an anderer Stelle gemacht habe und die sich auf meinen ersten vergeblichen Versuch stützte, korrigieren. Es tritt sonach der Darm in die Reihe der Organe, welche Harnsäurebildner sind, und es ist diese Beobachtung sicher von erheblicher Wichtigkeit, wenn man die zentrale Stellung des Darms im menschlichen Stoffwechsel berücksichtigt.

Niere.

Daß die Niere harnsäurezerstörende Fähigkeiten besitzt, ist durch die Untersuchungen von Wiener, welche ich in vollem Umfang bestätigen konnte, bereits festgestellt. Dagegen ist die Frage noch eine offene, ob sie auch imstande ist, Harnsäure zu bilden. Die folgenden Versuche sollen darüber Aufschluß geben:

Versuchsreihe VII.

a) 400 ccm Nierenextrakt²⁾ gehen 3 Tage lang unter ständiger Luftdurchleitung bei ca. 40°.

¹⁾ Deutsch. Arch. f. klin. Medizin, Bd. LXXXI., S. 423.

²⁾ 450 g fein zerkleinerte Niere + 2000 g H₂O + 10 ccm Chloroform werden 2 Stunden gerührt und dann einen halben Tag bei Zimmertemperatur stehen gelassen; hernach wird koliert und filtriert. 400 ccm davon enthalten 0,05 g Basenstickstoff (nach Aufschluß durch Kochen mit H₂SO₄ und nachheriger, zweimal wiederholter Basenfällung erhalten).

Die Verarbeitung auf Purinkörper ergab ein vollkommen negatives Resultat.

b) 400 ccm Nierenextrakt + 0,2 g in wenig Normalnatronlauge gelöster Harnsäure ebenso angesetzt.

Es wurde keine Spur von Harnsäure wiedergefunden.

c) 400 ccm Nierenextrakt + 0,2 g in wenig Normalnatronlauge gelösten Guanins ebenso angesetzt.

Auf Purinkörper verarbeitet findet sich keine Spur davon.

Versuchsreihe VIII.

Die folgenden 3 Versuche sind der Sicherheit wegen nochmals mit Guanin angesetzt. Die Darstellung des Extraktes war folgende: Zwei Rindernieren wurden mit der Fleischhackmischung fein zerkleinert, der erhaltene Brei mit Kieselgur aufs sorgfältigste zerrieben, nunmehr das Ganze mit zwei Liter Wasser unter Zugabe von 15 ccm Chloroform suspendiert und zwei Stunden mit dem automatischen Rührer bearbeitet. Darauf blieb die Suspension ca. 20 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Jetzt wurde koliert und filtriert und mit dem noch etwa trüben Filtrat die Versuche angesetzt.

Vor Verarbeitung auf Harnsäure und Basen wurde nach Beendigung der Versuche jede einzelne Versuchsflüssigkeit durch Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure auf 2% gebracht und so 3 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Dann quantitative Bestimmung nach der Krüger-Schittenhelmschen Methode.

a) Leerversuch: 400 ccm Nierenextrakt wurden mit 4 ccm Normalnatronlauge versetzt, 3 Tage unter ständiger Luftdurchleitung und Chloroformzugabe bei ca. 40° gehalten.

Gefunden: keine Harnsäure.

Basenstickstoff = 0,009 g.

b) 400 ccm Nierenextrakt + 0,3 g in ca. 4 ccm Normalnatronlauge gelösten Guanins ebenso angesetzt.

Gefunden: keine Harnsäure.

Basenstickstoff = 0,038 g.

Nach Abzug der im Leerversuch erhaltenen Basenstickstoffmenge wurden auf Guanin berechnet 0,063 g wiedergefunden.

Es waren also nur noch 21% des zugesetzten Guanins zurückgewonnen.

c) 400 ccm + 0,3 g in ca. 4 ccm Normalnatronlauge gelösten Guanins ebenso angesetzt.

Gefunden: Spuren von Harnsäure.

Basenstickstoff = 0,027 g.

Nach Abzug der im Leerversuch erhaltenen Basenstickstoffmenge wurden auf Guanin berechnet 0,038 g wiedergefunden. Es waren also nur noch 12,7% des zugegebenen Guanins zurückgewonnen.

Nach allen diesen Versuchen war es so gut wie sicher, daß die Niere wohl Harnsäure zu bilden imstande ist, dieselbe aber sofort wieder der weiteren Zerstörung¹⁾ anheimfällt, wodurch ihre Auffindung unmöglich gemacht ist. Da jedoch nicht absolut ausgeschlossen schien, daß das Guanin in der Niere zerstört wird, ohne daß vorher Harnsäure entsteht, so setzte ich einen Versuch mit Guanin im Thermostaten an, nachdem ich mich überzeugt hatte, daß die Harnsäurezerstörung durch Nierenextrakt ebenda auch vor sich geht.

d) 300 ccm Nierenextrakt + 0,3 g in Normalnatronlauge gelöster Harnsäure bleiben mit Chloroform versetzt 14 Tage lang im Thermostaten bei 37—38°.

Es wurde keine Harnsäure wiedergefunden.

e) 300 ccm Nierenextrakt + 0,2 g in wenig Normalnatronlauge gelösten Guanins bleiben 4 Wochen im Brutschrank bei 37—38°.

Nach Aufschluß durch Kochen mit H_2SO_4 wurden 0,15 g typisches Xanthin (identifiziert durchs Nitrat, welches die verlangte Kristallform zeigte) isoliert.

Im Filtrat konnten mit der Silberfällung noch Basen isoliert werden, deren Stickstoffgehalt = 0,029 g betrug.

¹⁾ Bei einigen der Versuche konnte nach Eindampfen in salzsaurer Lösung und ca. 1stündigem Stehen bei Zimmertemperatur in der minimalen Ausscheidung eine Substanz konstatiert werden, welche die Murexidprobe gab. Es handelt sich da jedenfalls um Spuren der intermediären Harnsäure.

Berechnet man beides zusammen auf Guanin, so erhält man 0,212 g Guanin.

Der Versuch¹⁾ beweist, daß in der Niere, wie ich schon in meiner letzten Mitteilung ausführte, Guanin in Xanthin übergeführt wird, daß aber eine Zerstörung des Guanins resp. Xanthins, ohne daß dieselben vorher in Harnsäure umgewandelt werden, nicht statthat.

Der folgende Versuch illustrierte nochmals die Fähigkeit der Niere, Guanin in Xanthin überzuführen.

f) 800 ccm Nierenextrakt + 1,0 g in Normalnatronlauge gelösten Guanins werden unter Chloroform 8 Tage lang im Brutschrank gehalten.

Nach Kochen mit verdünnter Schwefelsäure wie gewöhnlich behandelt.

Gefunden: 0,05 g Guanin.

Im Guaninfiltrat, über das Xanthinnitrat gereinigt.

Gefunden: 0,81 g Xanthin.

Analyse:

0,15 g Substanz verbrauchten 39,3 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalsalzsäure

Gefunden: 36,68 % N.

Es waren also an Stelle der 1,0 g Guanin gefunden worden 0,05 g Guanin und 0,81 g Xanthin.

Auch die Niere reiht sich also den übrigen Organen an, was die Umsetzung der Aminopurine und die Harnsäurebildung anbelangt. Sie hat aber zugleich auch eine äußerst lebhaft harnsäurezerstörende Fähigkeit. Über die Isolierung des harnsäurezerstörenden Fermentes berichte ich gesondert.

Thymus.

Daß die Thymusdrüsensubstanz Fermente enthält, welche die Aminopurine in Oxypurine umwandelt, bedarf keiner weiteren

¹⁾ Ein zweiter Versuch wurde ebenso angesetzt, nur wurde der Nierenextrakt vorher eine halbe Stunde im Autoklaven auf 100° erhitzt gehalten. Es fand sich beim Abbruch des Versuches nach Ablauf von 4 Wochen 0,276 g Guanin, wovon 0,145 g als Guaninchlorhydrat direkt, der Rest als Silberfällung aus dem Filtrat desselben gewonnen wurde.

Versuche mehr, nachdem Jones¹⁾ das Auftreten von massenhaftem Xanthin bei der Selbstverdauung der Thymusnucleoproteide erwies. Auch meine schon in meiner letzten Mitteilung angeführten Untersuchungen kamen zu demselben Resultat. Dagegen fehlen noch eingehendere Untersuchungen über die Harnsäurebildung resp. Zerstörung in diesem Organ.²⁾

Meine darauf hinzielenden Versuche, welche genau so angesetzt waren wie die sämtlichen derartigen Versuche, kamen zu einem negativen Resultat.

Knochenmark.

Ich führe meinen Versuch, welchen ich mit einem wässerigen Auszug von 100 g rotem Knochenmark (Kälberknochen) angestellt habe, der Vollständigkeit wegen an, wobei ich jedoch sofort bemerke, daß eine Wiederholung desselben unbedingt notwendig erscheint. Ich habe dieselbe bis dahin unterlassen, weil es in Göttingen überaus schwer hält, rotes Knochenmark (gelbes, welches leicht zu beschaffen ist, dürfte als im wesentlichen aus Fett bestehend ungeeignet sein) in größerer Menge zu erhalten.

Versuchsreihe IX.

a) 400 ccm Extrakt + 0,2 g in Normalnatronlauge gelöst Guanins wie immer unter ständiger Luftdurchleitung 3 Tage angesetzt.

Es fanden sich Spuren eines die Murexidprobe gebenden Körpers.

b) 400 ccm Extrakt + 0,2 g in Normalnatronlauge gelöster Harnsäure.

Wiedergefunden 0,144 g Harnsäure.

Die Versuche beweisen nichts Sicheres; doch scheint immerhin die Möglichkeit vorzuliegen, daß das Knochenmark eine Rolle im Harnsäurestoffwechsel spielt.

Resümiere ich nun nochmals die Hauptresultate meiner Versuche, so ergibt sich aus ihnen, daß die Milz, die Lunge,

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 35.

²⁾ Wiener, l. c. S. 392, hat auch für die Thymusdrüse ein geringes Bildungsvermögen von Harnsäure gefunden.

die Leber, der Darm, der Muskel und die Niere des Rindes die Fähigkeit besitzen, die Purinbasen in Harnsäure umzusetzen, und daß die Niere, der Muskel und die Leber die neugebildete Harnsäure weiter zu zerlegen vermögen, während diese Fähigkeit der Milz und der Lunge abgeht.

Der Weg, welcher bei der Umsetzung der Purinbasen in Harnsäure eingeschlagen wird, ist am genauesten und vollständigsten festgestellt für die Milz und die Lunge. Insbesondere die letztere hat sich als äußerst geeignet für diese Versuche erwiesen, da aus ihr auf relativ einfache Weise hoch wirksame Extrakte gewonnen werden können, welche äußerst arm an Purinkörpern sind. Es hat sich denn gefunden, daß das Guanin zuerst in Xanthin umgesetzt wird, welches dann seinerseits zu Harnsäure oxydiert wird. Das Adenin wird in Hypoxanthin umgewandelt und dieses wiederum sofort zum Teil zu Xanthin oxydiert. Setzt man die Versuche unter günstigen Oxydationsbedingungen an, also unter ständiger Sauerstoffzufuhr, so geht die Umsetzung Adenin — Hypoxanthin — Xanthin — Harnsäure glatt und quantitativ vor sich. Diese Reaktionen kommen in allen fünf Organen gleichmäßig zustande, nur haben sich die Extrakte der Milz, Lunge und Niere als etwas wirksamer erwiesen, wie die der Leber und des Muskels. Fürs rote Knochenmark ist es einigermmaßen wahrscheinlich gemacht, daß auch ihm diese Funktionen zukommen und für die Thymus¹⁾ ist es sicher, daß wenigstens eine Umsetzung der Aminopurine in Oxypurine nach obigem Schema vor sich geht, wenn auch vielleicht die höchste Oxydationsstufe, die Harnsäure, nicht erreicht wird. Immerhin müssen für die Thymus nach dieser Richtung weitere Versuche erst die Entscheidung bringen. Bemerkenswert ist, daß ich bei meinen Versuchen weder auf das 6-Amino-2-8-Dioxypurin noch auf das 2-Amino-6-8-Dioxypurin gestoßen bin. Nikolaier²⁾

¹⁾ Der Thymusdrüse gleichzustellen ist in ihrer Wirkung auf die Aminopurine das Pankreas (vergl. die Untersuchungen von Kutscher, Jones und Mitarbeiter, Schenk u. a.).

²⁾ Zeitschrift f. klin. Medizin, Bd. XLV, S. 359.

hat bekanntlich nach subkutaner Einverleibung von Adenin an Ratten 6-Amino-2-8-Dioxyypurin aus deren Nieren isolieren können. Der Umstand, daß ich kein positives Resultat nach dieser Richtung gefunden habe, erklärt sich vielleicht aus der Tatsache, daß ich die Organe einer anderen Tierart zu meinen Versuchen benutzte. Es ist ja mannigfach beobachtet, daß wesentliche Unterschiede bestehen im Abbau der Purinkörper bei verschiedenen Tiergattungen (Salkowski, Krüger, Burian und Schur u. a.).

Daraus, daß die Harnsäurebildung und die Harnsäurezerstörung keineswegs Hand in Hand gehen, vielmehr die letztere auf ganz bestimmte Organe beschränkt erscheint, während die erstere fast durchweg anzutreffen war, geht schon hervor, daß es sich dabei um zwei völlig getrennte Fermente handelt. Mit noch größerer Sicherheit ergibt es sich daraus, daß die Isolierung der bei diesen Umsetzungen tätigen Fermente auf ganz verschiedene Weise bewerkstelligt werden muß.

Die bei der Umsetzung der Aminopurine in Harnsäure tätigen Fermente können, wie meine Versuche mit der Milz beweisen, mit der von Jakoby¹⁾ angegebenen Aussalzung durch Ammonsulfat isoliert werden, während eine harnsäurezerstörende Fermentlösung, wie meine in der folgenden Arbeit mitgeteilten Versuche beweisen, aus der Niere durch die Rosellsche Isoliermethode, nicht aber durch die Jakobysche erhalten werden kann. Das harnsäurezerstörende Ferment ist also jedenfalls ein besonderes Ferment, welches mit den harnsäurebildenden nichts zu tun hat, und ich möchte vorschlagen, demselben der Kürze halber in Analogie zur Glykolyse die Bezeichnung urikolytisches Ferment (Uricolyse) zu geben.

Die Harnsäurebildung geht in zahlreicheren Organen vor sich, als die Harnsäurezerstörung. Es hat sich gefunden, daß auch in Organen, in welchen meine ersten Versuche ein scheinbar negatives Resultat erzielt hatten (Darm, Niere), eine ausgiebige Harnsäurebildung statthat. Meine Untersuchungen ergaben nun die wichtige Tatsache, daß bei einer Ver-

¹⁾ Diese Zeitschrift, 1900, Bd. XXX, S. 135.

suchsanordnung ohne Sauerstoffzufuhr nur eine Umwandlung der Aminopurine (Adenin und Guanin) in die Oxypurine (Hypoxanthin und Xanthin) statthat, während aber bei lebhafter Sauerstoffzufuhr eine Oxydation der Oxypurine zu Harnsäure glatt durchgeführt wird. Dieser Umstand, zusammengekommen mit der Beobachtung, daß eine Oxydation zu Harnsäure in der Thymus scheinbar nicht geschieht, obwohl die Aminopurine in Oxypurine umgesetzt werden, führt zu der notwendigen Folgerung, wie ich schon in meiner letzten Mitteilung ausgeführt habe, daß zwei verschiedene Fermente angenommen werden müssen, nämlich eines, welches Adenin in Hypoxanthin und Guanin in Xanthin umsetzt, und eines, welches die Oxypurine zu Harnsäure oxydiert. Das letztere ist schon allgemein anerkannt und Burian hat vorgeschlagen, dasselbe Xanthinoxydase zu benennen, eine Bezeichnung, welcher ich absolut beipflichte. Das erstere, also dasjenige Ferment, welches die Aminopurine in Oxypurine umwandelt, hat zu Differenzen zwischen Jones und mir geführt. In der nächstfolgenden Mitteilung beschäftigte ich mich eingehender mit denselben und bringe die Beweise dafür, daß die Annahme von Jones, wonach es sich dabei um zwei verschiedene Fermente handeln soll, eine «Guanase» und eine «Adenase», als hinfällig zu betrachten ist. Vielmehr handelt es sich um ein und dasselbe Ferment, welches hydrolytisch (desamidierend) wirkt. Ob dieses Ferment ein ganz spezifisches ist und nur auf die Aminopurine einwirkt, oder ob es in gleicher Weise auch noch zahlreiche andere Körper beeinflußt, kann m. E. vorläufig wenigstens nicht sicher entschieden werden. Ich halte daher eine «Taufe» dieses Fermentes für absolut überflüssig.

Es gestaltet sich also der Vorgang derart, daß zunächst das hydrolytische Ferment Adenin und Guanin zu Hypoxanthin und Xanthin umwandelt; darnach setzt die Xanthinoxydase ein und setzt das Hypoxanthin in Xanthin und das Xanthin in Harnsäure um. Als drittes kommt dazu das uricolytische Ferment und bewirkt eine weitere Zerstörung der Harn-

säure, als deren teilweise Endprodukte Glykokoll¹⁾ (Wiener) und Harnstoff (Ascoli u. a.) anzusehen sind.

Die Xanthinoxydase vermag bereits bei Gegenwart von wenig Sauerstoff zu wirken, was aus der teilweisen Umwandlung des Hypoxanthins zu Xanthin im Lungenextrakt hervorgeht. Bemerkenswerterweise wird unter diesen Umständen aber so gut wie keine Harnsäure gebildet. Es bietet also offenbar C₈ im Purinkern ganz erheblich größere Schwierigkeiten für die Oxydation wie C₆, und es bedarf einer recht lebhaften Sauerstoffzufuhr, um die Oxydation auch an C₈ zustande zu bringen.

Es bliebe noch eine auffallende Erscheinung zu erklären, nämlich diejenige, daß die bei der Autolyse ganzer Organe gefundenen Resultate sich nicht in allen Punkten decken mit den Ergebnissen meiner systematischen Fermentversuche. Ich bin nun der Ansicht, daß die Autolyse ganzer Organe keine geeignete Versuchsanordnung ist, um derartige Verhältnisse genau zu studieren. Es entstehen dabei zahllose, vor allem auch saure, Produkte, welche einerseits dazu geeignet sind, die Fermentreaktionen in ihrer Intensität zu stören oder vielleicht zu modifizieren; andererseits aber könnte durch die Änderung der Reaktion etc. auch eine Ausfällung gewisser schwer löslicher Substanzen, wie z. B. des Guanins, hervorgerufen werden, welche eintritt, sobald dasselbe durch die «Nuclease» in Freiheit gesetzt ist, und dadurch veranlaßt, daß das ungelöste Guanin weiteren Fermenteinflüssen entzogen wird. Auf solche Weise ließen sich die widersprechenden Versuche erklären, welche z. B. bei der Pankreasautolyse erhoben wurden. Dabei hat Schenk²⁾ Guanin und Hypoxanthin, aber kein Adenin und Xanthin gefunden; Levene³⁾ dagegen gewann unter denselben Bedingungen vorwiegend Xanthin und Hypoxanthin und konnte Guanin nur noch in geringer Menge, Adenin nicht mehr nach-

¹⁾ Auch mir gelang es inzwischen, Glykokoll als Zersetzungsprodukt der Harnsäure nachzuweisen, worüber ich später berichten werde.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 408.

³⁾ The American Journal of Physiology, Vol. XII, p. 276.

weisen und Jones und Partridge¹⁾ endlich stellten fest, daß im Pankreas ein Enzym besteht, welches Guanin in Xanthin umwandelt. Im ganzen also kann man wohl die autolytischen Befunde als eine Bestätigung meiner Versuche auffassen, da ja vorwiegend Oxyपुरine als Endprodukt festzustellen waren. Es muß jedoch gleichzeitig in Anbetracht der differierenden Resultate als sicher angenommen werden, daß die Autolyse ganzer Organe nicht geeignet ist, die Wirkung der Fermente auf die Nucleinsubstanzen klar zu veranschaulichen.

Ich möchte übrigens hierzu kurz erwähnen, daß auch ich eine gewisse Analogie der Autolyse mit meinen Fermentversuchen festzustellen vermochte.

Versuchsreihe X.

Eine steril eingelegte Hundemilz wurde über ein halbes Jahr lang der Autolyse im Eisschrank unterworfen und dann ca. 1 Jahr unter Alkohol aufgehoben.

Das Endprodukt wurde nunmehr fein zerkleinert, durch Kochen mit 2%iger Schwefelsäure, wie üblich, aufgeschlossen und die Purinbasen, wie oftmals beschrieben, isoliert.

Es wurden gefunden 0,18 g Xanthin und 0,12 Hypoxanthin. Adenin und Guanin konnten nicht aufgefunden werden.

Es waren also in diesem Versuch Oxyपुरine als Endprodukte gefunden worden, ganz analog den Befunden bei meinen Fermentversuchen mit Rindermilz.

Ich unterlasse es, an dieser Stelle näher darauf einzugehen, inwiefern meine Resultate für die Pathologie des Stoffwechsels und insbesondere der Gicht von Wichtigkeit sind. Es bleibt ja auch noch abzuwarten, welchen Umfang die von Burian neu entdeckte synthetische Bildung von Purinbasen im Muskel anzunehmen imstande ist.

¹⁾ l. c.

Zu den Versuchen von Jones, Partridge und Winternitz über das Fehlen des Guanin zu Xanthin umwandelnden Fermentes in Milz und Leber des Rindes.

Von
Alfred Schittenhelm.

(Aus dem Laboratorium der medizinischen Klinik zu Göttingen: Geheimrat Ebstein.)
(Der Redaktion zugegangen am 10. Mai 1905.)

Jones und Partridge¹⁾ haben den Namen «Guanase» aufgestellt für ein Enzym, welches die Überführung von Guanin in Xanthin zustande bringt. Sie konnten die Anwesenheit dieses Enzyms in der Thymus, der Nebenniere und dem Pankreas feststellen, während es in der Milz fehlen soll. Dagegen findet sich nach ihren Untersuchungen in der Milz ein anderes Enzym, dem sie den Namen «Adenase» geben, weil es Adenin in Hypoxanthin umwandelt; die «Adenase» findet sich außerdem in der Thymus, der Nebenniere und dem Pankreas. Jones und Winternitz²⁾ haben die Untersuchungen weitergeführt. Sie haben einerseits das Vorkommen der «Adenase» in der Leber festgestellt, andererseits das Fehlen der «Guanase» für dasselbe Organ und nochmals für die Milz bewiesen. Auf diese Befunde stützt sich ihre Behauptung, daß die «Guanase» und die «Adenase» zwei von einander verschiedene Fermente seien. Sie halten also die Unabhängigkeit der Fermente von einander für erwiesen. Am Schluß ihrer Mitteilung sprechen sie die Ansicht aus, daß ihre Resultate nicht zu der Meinung führen können, daß irgend eines der Fermente in einer der Drüsen völlig fehlte und daß man vielleicht doch durch genügend lange dauernde Digerierungen die Anwesenheit der Guanase in Leber und Milz erweisen könne. Es sei noch erwähnt, daß sie noch weiterhin eine Oxydase annehmen, welche Hypoxanthin in Xanthin umwandelt und welche sich in Leber und Milz, nicht aber im Pankreas vorfindet.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 343. Der Redaktion zugegangen 4. Juli 1904.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 1. Der Redaktion zugegangen 7. Januar 1905.

Jones und seine Mitarbeiter haben, was das Fehlen der «Guanase» in Leber und Milz anbelangt, völlig übersehen, daß von verschiedenen anderen Seiten die Gegenwart derselben für eben diese Organe längst erwiesen ist. Jones und Partridge haben die Untersuchungen von Horbaczewski,¹⁾ Spitzer,²⁾ und Wiener³⁾ nicht in den Kreis ihrer Betrachtungen gezogen, wohl deshalb, weil sie annahmen, daß keine weiteren Beziehungen zwischen ihren Untersuchungen und denen der genannten Autoren bestehen; ich werde aber späterhin ausführen, daß die Beziehungen recht enge sind. Jones und Winternitz haben nun aber auch meine Veröffentlichungen⁴⁾ vollkommen unbeachtet gelassen, obwohl sie dieselben Ziele verfolgen und ich, wenigstens was die Umsetzung des Guanins in Milz und Leber anbelangt, zu einem gerade entgegengesetzten Resultate gelangte.

Hätten Jones und seine Mitarbeiter diese Arbeiten, sowie diejenigen der anderen Autoren, gebührend berücksichtigt, so wären sie sicher auf die Tatsache aufmerksam geworden, daß ihre Resultate sich mit den bisherigen Feststellungen nicht vereinigen lassen. Spitzer sowohl wie ich konnten feststellen, daß im Milzetrakt eine fermentartige Kraft vorhanden ist, welche die Umsetzung von Guanin, sowohl wie von Adenin in Harnsäure auszuführen vermag. Dasselbe haben wir für die Leber bewiesen und auch Burians⁵⁾ und Wieners Untersuchungen stimmen damit überein. Wie aber soll Guanin in Harnsäure umgesetzt werden, wenn die Feststellungen Jones' und seiner Mitarbeiter richtig wären? Auch wir hätten doch dann nicht Harnsäure, sondern Guanin wiederfinden müssen. Da wir aber unzweifelhafte Harnsäure bekamen, so mußte das Guanin entsprechenden Veränderungen unterliegen, wobei Zwischenprodukte

¹⁾ Monatshefte der Chemie, 1891, Bd. XII, S. 221.

²⁾ Arch. f. Physiol., 1899, Bd. LXXVI, S. 192.

³⁾ Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmak., 1899, Bd. XLII, S. 373.

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 251. Der Redaktion zugegangen 27. Juni 1904.

Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 228. Der Redaktion zugegangen 3. Oktober 1904.

⁵⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 497.

gebildet werden, welche aber nur das Xanthin und das 2-Amino-6-8-Dioxyypurin sein konnten. Auf diese Überlegungen habe ich meine Untersuchungen aufgebaut und kam tatsächlich zu dem Resultat, daß die Milz Fermente enthält, welche sowohl Guanin wie Adenin in Xanthin (resp. Hypoxanthin-Xanthin) umsetzen und dieses wiederum zu Harnsäure oxydieren. Das Nähere habe ich bereits in vorstehender Mitteilung rekapituliert.

Wie kommen nun Jones und seine Mitarbeiter zu den abweichenden Resultaten? Beim Vergleich der beiden Versuchsanordnungen fällt in erster Linie auf, daß sie die Körper als salzsaure resp. schwefelsaure Salze zusetzten, ich aber in natronalkalischer Lösung. Dieser Umstand könnte wohl zu Differenzen der Resultate Veranlassung geben. Das Guanin ist bekanntlich unlöslich in Wasser und seine Salze sind ebenfalls als schwerlöslich bekannt. Jones und seine Mitarbeiter aber setzten das Guanin entweder als Hydrochlorat oder aber, indem sie die Säure desselben vorher mit Ammoniak neutralisierten, als freie Base zu dem jeweiligen Organgemisch. Es kommt aber bei dieser Versuchsanordnung derselbe Übelstand zur Geltung, welchen auch Burian¹⁾ bei der Prüfung des Leberextraktes auf seine harnsäurezerstörende Fähigkeit hervorhebt. Setzt man nämlich die umzusetzende schwerlösliche Substanz (in Burians Fall die Harnsäure, in vorliegendem das Guanin) in ungelöstem Zustande zu, so muß sie erst langsam während der Digestion in Lösung gehen, wobei es nie zur völligen Sättigung kommt. Der Verlauf der Reaktion wird also ein sehr protrahierter und man kann sich wohl vorstellen, daß ein nicht unbeträchtlicher Teil des Guanins, insbesondere wenn dasselbe auf dem Boden des Gefäßes liegend in zugesetztes Chloroform eingeschlossen ist, der Einwirkung der Fermente entgeht, sodaß es später unverändert wieder gefunden wird.²⁾ Anders verhält sich die Sache beim Adenin, welches als Sulfat

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 506.

²⁾ Organbrei bietet scheinbar bessere Lösungsbedingungen für ungelöst zugegebenes Guanin als Organextrakt; durch diese Annahme ließe sich ungezwungen der Umstand erklären, daß bei Verwendung von Pankreasbrei ein positives Resultat erzielt wurde.

zugegeben wurde. Dieses Salz ist sehr leicht löslich und bietet daher den Fermenten von vornherein günstige Angriffsbedingungen. Damit mag zum Teil wenigstens zusammenhängen, daß Jones und seine Mitarbeiter eine Umwandlung des Adenins durch die Fermente leicht konstatieren konnten, während das Guanin unverändert wiedergewonnen wurde.

Die folgenden Versuche sind zur Klärung dieser Verhältnisse angestellt.

Versuchsreihe I.

a) 400 ccm Milzextrakt ¹⁾ gehen bei ca. 40° unter ständiger Luftdurchleitung drei Tage lang. (Leerversuch).

Erhalten 0,14 g Harnsäure.

b) 400 ccm Milzextrakt + 0,35 g Guaninchlorhydrat, welches vorher in wenig Normalnatronlauge gelöst worden war, analog angesetzt.

Erhalten 0,4 g Harnsäure.

0,1738 g Substanz verbrauchten 41,2 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalsalzsäure

Gefunden: 33,19% N.

Demnach waren 98,8% des zugesetzten Guaninchlorhydrats als Harnsäure wiedergefunden. Im Filtrat gab eine Silberfällung nur noch minimalen Niederschlag.

c) 400 ccm Milzextrakt + 0,35 g Guaninchlorhydrat, welches vorher in dem gerade zur vollkommenen Lösung nötigen Überschuß Normalsalzsäure gelöst war, analog angesetzt.

Erhalten 0,89 g Harnsäure.

0,1582 g Substanz verbrauchten 36,9 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalsalzsäure

Gefunden: 33,29% N.

Demnach waren 95,1% des zugesetzten Guaninchlorhydrats als Harnsäure wiedergefunden. Im Filtrat gab eine Silberfällung nur noch minimalen Niederschlag.

d) 400 ccm Milzextrakt + 0,35 g Guaninchlorhydrat, welches vorher in Wasser aufgeschwemmt und mit Ammoniak sorgfältig neutralisiert wurde, analog angesetzt.

¹⁾ Die Extrakte wurden auf die in meinen früheren Arbeiten genauer beschriebene Weise hergestellt. Ich mache auch auf den Umstand aufmerksam, daß meine Milzextrakte mit viel größeren Mengen Wasser im Verhältnis zur angewandten Menge Milzpulpa hergestellt wurden, wie die von Jones und Winternitz.

Erhalten 0,38 g Harnsäure.

0,15 g Substanz verbrauchten 35,5 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalsalzsäure

Gefunden: 33,13% N.

Im Filtrat wurde mit ammoniakalischer Silberlösung ein Niederschlag erzeugt, dessen Stickstoff 6,7 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalsalzsäure entsprach.

Es waren also 91,2% des zugesetzten Guaninchlorhydrates als Harnsäure wiedergefunden.

e) Derselbe Versuch in derselben Weise angesetzt.

Erhalten 0,37 g Harnsäure.

0,1194 g Substanz verbrauchten 28,3 ccm $\frac{1}{10}$ -Normal-HCl

Gefunden: 33,18% N.

Im Filtrat fanden sich noch Purinbasenreste (Silberfällung), deren Stickstoff 12,5 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalsalzsäure entsprach.

Es waren also 87,5% des zugesetzten Guaninchlorhydrates als Harnsäure wiedergefunden.

f) 300 ccm Milzextrakt + 0,35 g Guaninchlorhydrat, welches in Wasser aufgeschwemmt zugesetzt wurde, analog angesetzt.

Erhalten 0,34 g Harnsäure

Gefunden: 33,31% N.

Im Filtrat wurde mittels der Silberfällung eine Restbasenmenge erhalten, deren Stickstoffgehalt 15,6 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalsalzsäure entsprach.

Es waren also 79,9% des zugesetzten Guaninchlorhydrats als Harnsäure wiedergefunden.

g) Derselbe Versuch wiederholt.

Erhalten 0,25 g Harnsäure

Gefunden: 33,38% N.

Es waren demnach 41,8% des zugesetzten Guaninchlorhydrats als Harnsäure wiedergefunden.

Aus den Versuchen geht klar hervor, daß das gelöst zugegebene Guanin durch Milzextrakt bei Zuleitung von Sauerstoff quantitativ in Harnsäure umgewandelt wird, einerlei ob zur Lösung Natronlauge oder Salzsäure benutzt wurde. Die Wirkung der dabei in Betracht kommenden Fermente wird also durch kleinere Mengen Säure

oder Alkali in ihrer Gesamtheit nicht beeinflußt. Die Umsetzung verläuft aber weniger vollständig, wenn das Guanin in ungelöster Form zugegeben wird, wenn sie auch, wenigstens in dem größeren Teil der Versuche, trotzdem eine ganz ausgiebige war. Man muß dabei jedenfalls als förderndes Agens in Betracht ziehen, daß durch die mechanische Bewegung, welche in der Reaktionsflüssigkeit durch die Luftdurchleitung beständig hervorgerufen wurde, die Lösungsbedingungen wesentlich verbessert werden. Jedenfalls kann es gar keinem Zweifel unterliegen, daß das Guanin, wie es auch zugesetzt werden mag, vom Milzextrakt resp. dessen Fermenten zu Harnsäure umgesetzt wird, und die notwendige Folgerung davon ist, daß derselbe auch eine «Guanase» enthalten muß und sogar, im Hinblick auf den quantitativen Verlauf der Reaktion, eine sehr wirksame.

Daß in der Milz in der Tat ein Ferment existiert, welches Guanin in Xanthin umwandelt, habe ich schon in meiner früheren Mitteilung durch mannigfache Versuche erwiesen und es gelang mir sogar ohne weiteres, mittels der fraktionierten Sättigung durch Ammonsulfat einen Weg zu finden, auf dem das Ferment, wenn auch nicht in reinem Zustand, so doch in einer relativ einfach zusammengesetzten wässerigen Lösung in wirksamer Form isoliert werden kann. Obwohl eigentlich aus den vorstehenden Versuchen über die Harnsäurebildung schon sicher hervorgeht, daß auch bei der Versuchsanordnung von Jones und seinen Mitarbeitern, also bei Zugabe des Guanins in Form des Hydrochlorates, eine Umsetzung in Xanthin erfolgen muß, so habe ich doch, um jeden Zweifel zu beheben, den folgenden Versuch angesetzt. Ich stelle demselben einen weiteren Versuch gegenüber, in welchem das Guanin nach meiner Art in natronalkalischer Lösung zugegeben wurde, damit man sieht, ob und wie sehr der quantitative Verlauf abhängig ist von der Form, in der das Guanin zugegeben wird.

Versuchsreihe II.

a) 400 g Milzextrakt wurden mit 0,45 g in Wasser aufgeschwemmten Guaninchlorhydrats, dessen Säure vor dem

Zusetzen mit Ammoniak neutralisiert wurde, unter Chloroformzusatz neun Tage lang im Thermostaten bei 37° C. der Autodigestion überlassen.

Am 9. Tag wurde die ganze Menge nach Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure, so daß die Konzentration etwa 21,5% betrug, 3 Stunden lang am Rückflußkühler gekocht, hernach mit Natronlauge neutralisiert, siedend mit Essigsäure angesäuert und sofort vom ausgefallenen Eiweiß abfiltriert. Der Eiweißniederschlag wurde noch zweimal in Wasser suspendiert, mit NaOH gelöst und mit Essigsäure gefällt. Aus den vereinigten Filtraten wurden mit der Kupfersulfatbisulfitmethode die Basen gefällt. Die Kupferoxydulverbindungen wurden mit H₂S zerlegt und das Filtrat zur Trockene eingedampft. Der Trockenrückstand wurde mit verdünntem Ammoniak aufgekocht und kurze Zeit bei 60—70° digeriert. Nach 24stündigem Stehen im Eisschrank fiel ein geringer flockiger Niederschlag aus, welcher aber keine Purinbasen enthält.

Es war also kein Guanin mehr vorhanden.

Vom ammoniakalischen Filtrat wurde das Ammoniak abgedunstet und darauf die Lösung auf 5—10 ccm eingengt. Dabei kam Xanthin in typischen Krusten heraus.

Nach einigen Stunden wurde abfiltriert (Filtrat A) und das gewonnene Präparat auf bekannte Art ins Nitrat verwandelt. Es wurden

0,33 g Xanthinnitrat

gewonnen. Die Substanz zeigte vorzüglich ausgebildete typische Kristallform (Filtrat B). Zur Analyse wurde es ins freie Xanthin verwandelt und mit wenig Tierkohle gereinigt.

0,1022 g Substanz verbrauchten 26,8 ccm 1/10-Normalsalzsäure

Gefunden: 36,71% N

Verlaugt: 36,84% ».

Filtrat A und B werden vereinigt, neutralisiert und mit ammoniakalischer Silberlösung versetzt. Die Silberverbindungen der Basen werden in Wasser suspendiert, mit HCl in der Wärme zerlegt und das Filtrat des Chlorsilbers zur Trockene eingedampft. Nach Entfernung der überschüssigen Salzsäure durch Abdampfen mit Alkohol wurde der Rückstand in wenig

verdünntem Ammoniak gelöst und 24 Stunden im Eisschrank stehen gelassen. Dabei kam es zu keiner Ausfällung.

Also wiederum kein Guanin.

Die Flüssigkeit wurde nunmehr auf 5—10 ccm, nach Vertreiben des Ammoniaks, eingengt. Nach mehrtägigem Stehen hatten sich noch 0,06 g einer Substanz ausgeschieden, welche sich leicht in Ammoniak löste. Dieselbe wurde durch die Xanthinproben und durch das charakteristische salpetersaure Salz als Xanthin identifiziert.

Im Filtrat dieses Xanthinrestes war mit ammoniakalischer Silberlösung keine Fällung mehr zu erzeugen.

Es waren also an Stelle der 0,45 g Guaninchlorhydrat 0,293 g Xanthin gefunden worden. Bemerkenswerterweise war von dem zugegebenen Guanin auch nicht die Spur mehr wiedergefunden worden.

b) 400 ccm Milzextrakt wurden mit 0,4 g in ca. 6 ccm Normalnatronlauge gelösten Guanins versetzt und unter Chloroformzusatz 9 Tage lang bei 37° C. im Thermostaten gehalten.

Am 9. Tag wurde ebenso verfahren, wie bei Versuch a. Auch hier fand sich kein Guanin wieder.

Dagegen konnten

0,58 Xanthinnitrat

isoliert werden, welches typische Kristallform zeigte. Es wurde zur Analyse ins freie Xanthin verwandelt und bei 140° getrocknet.

0,114 g Substanz verbrauchten 29,7 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalsalzsäure

Gefunden: 36,48% N.

Aus den Filtraten wurde nochmals 0,07 g Xanthin isoliert, welches bei Umwandlung ins Nitrat typische Kristallform zeigte.

Es blieb im Restfiltrat nur noch eine ganz geringe Basenmenge, welche die weitere Verarbeitung nicht lohnte.

Es waren also im ganzen 0,48 g Xanthin wiedergewonnen worden.

Ich fand also in beiden Versuchen, einerlei ob ich das Guanin als Aufschwemmung seines Hydrochlorates oder als natronalkalische Lösung zugab, kein Guanin wieder, an Stelle desselben aber Xanthin. Das Resultat stimmt sehr gut zusammen mit den Ergebnissen der

Versuchsreihe I. Daß Jones und seine Mitarbeiter zu einem entgegengesetzten Resultat kamen, muß also unbedingt an ihrer Versuchsanordnung oder an der Isolierung der Substanzen gelegen haben. Ein guter Teil ihres Mißerfolgs mag jedenfalls in der Zugabe ungelöster Ausgangsmaterialien seine Ursache haben, besonders in den Versuchen, deren Dauer weniger als 9 Tage betrug.

Aus meinen Versuchen geht also klar hervor, daß die vermeintliche Beobachtung von Jones und seinen Mitarbeitern von dem Fehlen der «Guanase» in der Milz eine irrtümliche ist. Nachdem Burian und ich zeigen konnten, daß die Leber aus Purinbasen Harnsäure zu bilden vermag, und nachdem ich in der vorstehenden Mitteilung den experimentellen Beweis erbrachte, daß die Leber ebenso wie alle anderen bisher untersuchten Organe imstande ist, das Guanin in Xanthin umzuwandeln, bedarf es keiner weiteren Versuche mehr, um zu zeigen, daß Jones und seine Mitarbeiter auch bei diesem Organ mit ihrer Behauptung des Fehlens der «Guanase» einen Irrtum begingen. Es ist klar, daß die Ursache ihrer negativen Befunde ganz dieselbe ist, wie bei den Milzversuchen.

Der Umstand, daß in allen den Organen, in welchen eine Harnsäurebildung konstatiert werden konnte, sowohl Guanin wie Adenin in Harnsäure umgesetzt werden, bestätigt meine schon früher aufgestellte Behauptung von der Gleichartigkeit des Fermentes, welches auf die beiden Körper einwirkt; dieselbe wird noch mehr gestützt dadurch, daß auch das isolierte Ferment ohne weiteres beide Körper quantitativ umzuwandeln vermag. Es bedarf also eines hydrolytischen (desamidierenden) Fermentes und einer Oxydase zur Umwandlung der Aminopurine in Harnsäure. Nachdem meine Annahme somit eine feste experimentelle Grundlage erfahren hat, ist nach meiner Ansicht absolut sicher gestellt, daß es einer Einzelbenennung des Fermentes als «Guanase» und «Adenase», wie es Jones und seine Mitarbeiter wollen, nicht bedarf.

¹⁾ Siehe hierzu auch meine Ausführungen in der vorhergehenden Arbeit S. 149.

Über das uricolytische Ferment.

Von

Alfred Schittenhelm.

(Aus dem Laboratorium der medizinischen Klinik zu Göttingen: Geheimrat Ebstein.)

(Der Redaktion zugegangen am 10. Mai 1905.)

Daß die Harnsäurezerstörung eine Funktion ganz bestimmter Organe ist, geht aus meinen vorstehend mitgeteilten Versuchen mit Sicherheit hervor. Ich habe darin festgestellt, daß ein uricolytisches Ferment in der Niere, der Leber, dem Muskel und vielleicht dem Knochenmark des Rindes zu finden ist, während dagegen die Milz, die Lunge und der Darm wohl Harnsäure zu bilden, nicht aber zu zerstören vermag. Auch Wiener¹⁾ hat bereits früher festgestellt, daß der Niere, der Leber und dem Muskel des Rindes harnsäurezerstörende Fähigkeiten zukommen; Burian²⁾ hat dann für die Leber und den Muskel, Ascoli³⁾ für die Leber des Rindes dieselbe Beobachtung gemacht.⁴⁾

¹⁾ Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmak., Bd. XLII, S. 375.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 497 u. 532.

³⁾ Pflügers Archiv, Bd. LXXII, S. 340.

⁴⁾ Ähnliche Beobachtungen wurden außerdem an der Hunde-, Katzen- und Schweineleber gemacht. — Übrigens teilt Sir Lander Brunton in London (Zentralbl. f. Physiol., 1905, Bd. XIX, Nr. 1, S. 5) betreffs der Priorität mit, daß bereits im Jahre 1860 Stockvis in Amsterdam (Donders Archiv für die holländischen Beiträge, Utrecht 1860, Bd. II, S. 268) Harnsäurezersetzung durch Organbrei beobachtet habe. Später hat Brunton selbst in Gemeinschaft mit Bokenham die Versuche wieder aufgenommen und die Angaben von Stockvis bestätigt, daß nämlich Harnsäure zersetzt und Harnstoff gebildet wird durch Erwärmung von harnsauren Salzen mit Brei von Verdauungsleber, während Leber von Tieren, welche gefastet haben, Harnsäure nicht zersetzt (publiziert in Pawlows Festschrift, Arch. scienc., St. Petersburg 1904, Suppl.).

Wie ich bereits kurz mitteilte,¹⁾ ist es mir gelungen, das uricolytische Ferment zu isolieren, und ich will in folgendem darauf näher eingehen. Da unter den Rinderorganen die Niere am ausgiebigsten die Harnsäurezerstörung vermag, so habe ich an ihr meine Untersuchungen angestellt.

Da es mir gelungen war, das harnsäurebildende Ferment aus wässerigen Milzextrakten mittels Aussalzung durch Ammonsulfat isoliert zu erhalten, so versuchte ich zuerst auf diesem Wege zu einem Resultat zu gelangen. Ich bekam jedoch keine wirksame Lösungen. Ebensowenig führte die Fällung mit Alkohol zu einem befriedigenden Resultat.

Ich ging daher zu einer anderen Methode über und zwar zu der von Rosell²⁾ angegebenen, welche auf einer Ausfällung mittels Uranylacetat in alkalischer Lösung beruht. Dabei zeigte sich bald, daß auf diese Weise gut wirksame, harnsäurezersetzende Fermentlösungen erhalten werden können.

Die Methode gestaltet sich kurz folgendermaßen:

400—600 g fein zerkleinertes und mit Sand zerriebenes Nierengewebe wird mit zirka $\frac{1}{2}$ seines Volumens (ev. auch etwas mehr) Wasser angesetzt und einige Stunden auf der Schüttelmaschine geschüttelt. Dann wird koliert und die erhaltene Kolatur mit einer gesättigten Lösung von Uranylacetat unter gleichzeitiger Zufügung einer Mischung von Natriumkarbonat und Natriumphosphat, sodaß die Lösung stets alkalisch bleibt, so lange versetzt, bis sich grobe Flocken bilden, welche sich dann weiterhin gut absetzen. Man dekantiert und filtriert. Der Filtrerrückstand wird in 600—800 ccm 0,2%iger Soda-lösung fein verrieben oder besser einige Stunden geschüttelt, und bleibt dann ca. 12 Stunden stehen. Hierauf wird filtriert. Das Filtrat enthält das Ferment.

Versuch I.

250 ccm Fermentlösung + 0,3 g in wenig Normalnatron-lauge gelöste Harnsäure gehen 3 Tage lang unter Chloroform-zusatz und ständiger Luftdurchleitung bei ca. 40°.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 228.

²⁾ Über Nachweis und Verbreitung intracellulärer Fermente, Inaug.-Dissert., Straßburg 1901.

Wiedergewonnen 0,05 g Harnsäure.

Es waren also 83% der zugefügten Harnsäure zerstört worden.

Versuch II.

400 ccm Nierenfermentlösung + 0,5 g in wenig Normalnatronlauge gelöster Harnsäure 5 Tage lang ebenso angesetzt.

Wiedergefunden 0,05 g Harnsäure.

Es waren also 90% der zugefügten Harnsäure zerstört worden.

Versuch III.

300 ccm Fermentlösung + 0,3 g in 5—6 ccm Normalnatronlauge gelöster Harnsäure 3 Tage lang analog angesetzt.

Wiedergefunden keine Harnsäure.

Es waren also 100% der zugesetzten Harnsäure zerstört worden.

Versuch IV.

300 ccm Fermentlösung + 0,25 g in wenig Normalnatronlauge gelöster Harnsäure analog angesetzt.

Wiedergefunden 0,135 g Harnsäure.

Es waren also 46% der zugesetzten Harnsäure zerstört worden.

Die Versuche beweisen, daß es wohl gelingt, eine gut wirksame Lösung des uricolytischen Fermentes der Niere durch die Rosellsche Fällungsmethode zu erhalten.¹⁾ Um jedoch sofort dem Einwand zu begegnen, daß der alkalische Charakter der Lösung das wirksame Prinzip darstelle oder gar geringe Mengen in Lösung gebliebener Uransalze, und um andererseits zu beweisen, daß es tatsächlich ein Ferment ist, welches in meiner Versuchslösung die Uricolyse bewerkstelligt, setzte ich einige Versuche an mit derselben Fermentlösung, welche jedoch vorher im Dampftopf auf 80—100° erhitzt worden war.

¹⁾ Nicht immer gelingt es, gut wirksame Fermentlösungen zu erhalten. Hieran mögen zum Teil kleine, scheinbar gleichgültige Abweichungen in der Darstellung die Schuld tragen. Ob noch andere Faktoren mitspielen (verschiedene Quantität und Qualität der Nierenfermente? etc.), muß noch dahingestellt bleiben.

Versuch V.

250 ccm $\frac{1}{2}$ Stunde auf 100° erwärmter Fermentlösung + 0,3 g in wenig Normalnatronlauge gelöster Harnsäure analog angesetzt.

Wiedergewonnen 0,25 g Harnsäure.

Versuch VI.

300 ccm einer wenige Minuten auf 80° erhitzten Fermentlösung + 0,25 g in wenig Normalnatronlauge gelöster Harnsäure analog angesetzt.

Wiedergefunden 0,22 g Harnsäure.

Es war also in beiden Versuchen auch etwas Harnsäure verloren gegangen; jedoch ist der Unterschied so eklatant, daß gar kein Zweifel mehr bestehen kann an der Fermentnatur des zerstörenden Agens sowohl, wie an der Tatsache, daß das Ferment nach Rosell in wirksamer Form isoliert werden kann.

Die Fermentlösung ist sehr einfach zusammengesetzt, was aus der folgenden Analyse ersichtlich ist.

Auf 1000 Lösung kommen:

986,2	Wasser,
9,82	organische Substanz,
3,98	Ascherückstand,
1,187	Stickstoff.

Des weiteren ist hervorzuheben, daß die Lösung so gut wie gar keine Purinkörper enthält.

Das Ferment ist nicht dialysierbar und es gelingt daher, dasselbe durch Dialyse noch weiter zu reinigen.

Versuch VII.

400 ccm Fermentlösung, welche 3 Tage lang gegen fließendes Wasser dialysiert hatten, wurden mit 0,3 g in wenig Normalnatronlauge gelöster Harnsäure versetzt und 3 Tage lang wie gewöhnlich unter Luftdurchleitung bei ca. 40° gehalten.

Wiedergefunden 0,04 g Harnsäure.

Es waren somit 87 % der zugesetzten Harnsäure zerstört worden.

Der Versuch spricht eine deutliche Sprache. Auch hier lag eine wirksame Fermentlösung trotz Dialysierens vor.

Lange nach Abschluß dieser Versuche erschien eine Mitteilung von Wiener,¹⁾ welche ebenfalls unter Hinweis auf meine diesbezüglichen Versuche eine Methode angibt, auf welche das uricolytische Ferment aus der Niere isoliert werden kann. Er fällt den Organextrakt mit Essigsäure (0,2/250), von der er gewöhnlich die 3fache Menge zusetzte, mit Methylalkohol und Ammonsulfat. Die Niederschläge werden in Wasser aufgenommen, mit Karbonatlösungen verschiedener Konzentration neutralisiert und ausgelaugt und die zelligen Bestandteile mit Pepsinsalzsäure oder Trypsin verdaut. Dann wird nochmals mit Methylalkohol gefällt und mit Karbonatlösung der Niederschlag ausgezogen.

Ein bestimmtes Quantum der so gewonnenen Lösung schüttelt er mit einer gewogenen Menge Harnsäure bei 40° ca. 40 Stunden. Seine Resultate sind keine glänzenden. Von 0,125 g zugegebener Harnsäure findet er Mengen von 0,056, 0,08, 0,05, 0,097, 0,05, 0,086, 0,097 etc. g wieder.

Ich führe diese Methode an, ohne darüber selbst Erfahrungen zu haben.

Eine Vergleichung meiner mit der Rosellschen Fällung erhaltenen Resultate mit denen Wieners scheint mir jedoch ohne weiteres für eine erheblich bessere Brauchbarkeit der Rosellschen Methode zur Isolierung des uricolytischen Ferments zu sprechen.

¹⁾ Zentralbl. f. Physiol., Bd. XVIII, Nr. 22, S. 690.

Über die Ursache der Schwefelsäure-Fluoreszenzreaktion der Gallensäuren.

Von

Fritz Pregl.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Graz.)
(Der Redaktion zugegangen am 11. Mai 1905.)

Eine alte, empirische Reaktion der Gallensäuren ist die Schwefelsäurereaktion: in konzentrierter Schwefelsäure lösen sich die Gallensäuren schon in der Kälte, leichter bei gelindem Erwärmen; die Lösung zeigt eine gelbrote Farbe im durchfallenden Lichte und prachtvolle, grünliche Fluoreszenz im auffallenden Lichte.

Die Beziehungen, die anderweitig vielfach schon zwischen Farbe und Fluoreszenz einerseits und chemischer Konstitution andererseits ermittelt worden sind, luden um so mehr zu einer Untersuchung der genannten Reaktion ein, als bisher weder der diese Fluoreszenzerscheinung bedingende Körper isoliert, noch die Konstitution der Gallensäuren bis heute aufgeklärt ist.

Schon beim Anstellen dieser Reaktion im kleinen kann man die Beobachtung machen, daß dabei der Geruch nach schwefeliger Säure auftritt, und kann sich somit überzeugen, daß die Schwefelsäure hier die Rolle eines Oxydationsmittels spielt.

Für die Isolierung des die Fluoreszenzerscheinung bedingenden Reaktionsproduktes hat sich nach mehrfachen Änderungen folgendes Verfahren als geeignet erwiesen:

In einem Kölbchen übergießt man 20 g getrockneter Cholalsäure mit 50 ccm Eisessig, fügt unter Umschütteln 10 ccm konzentrierte Schwefelsäure zu, setzt ein Steigrohr auf und erhitzt über kleiner Flamme zum Sieden. Dabei färbt sich das Gemisch zuerst intensiv rot und es beginnen Ströme von

schwefeliger Säure zu entweichen; bei weiterem Erhitzen treten allmählich gelblich-grünliche und noch dunklere Farbentöne und reichliche Schwefelabscheidungen im Steigrohr auf, bis das weitere Erhitzen nach $\frac{5}{4}$ Stunden infolge Stoßens unterbrochen werden muß. Die noch warme Lösung gießt man in ca. ein Liter kalten Wassers und saugt die olivgrüne Fällung nach Zusatz von $\frac{1}{4}$ Volumen gesättigter Steinsalzlösung ab. Der erhaltene Niederschlag löst sich, noch feucht, sehr leicht in Äther; seine Lösung wird sofort einigemal mit Wasser ausgeschüttelt, um den Rest von Essigsäure zu entfernen, und hierauf so lange mit sehr verdünnter Natronlauge behandelt, bis diese nichts durch Säuren Fällbares mehr aufnimmt.

Diese alkalischen Ausschüttelungen zeigen im durchfallenden Licht gelbrote Färbung, im auffallenden eine grünliche Fluoreszenz. Zusatz von $\frac{1}{3}$ Volumen konzentrierter Steinsalzlösung oder konzentrierter Natronlauge fällt daraus das alkohollösliche Na-Salz einer organischen Säure, weshalb bei den Ausschüttelungen nur sehr verdünnte Na-Lauge zu verwenden ist, wenn Fällungen vermieden werden sollen. Mit verdünnter Schwefel- oder Salzsäure fällt aus den alkalischen Ausschüttelungen die freie, in Wasser unlösliche organische Säure aus, die, in konzentrierter Schwefelsäure gelöst, keine Fluoreszenz zeigt.

Hingegen zeigt der Rückstand der abdestillierten ätherischen Lösung diese Eigenschaft in hohem Maße: eine Spur davon, in kalter konzentrierter Schwefelsäure gelöst, verleiht dieser orangerote Färbung im durchfallenden und prachttvolle grünliche Fluoreszenz im auffallenden Lichte. Der gesuchte Körper ist demnach in der ausgeschüttelten ätherischen Lösung enthalten. Da er in keiner Weise zum Kristallisieren zu bringen war, mußte in anderer Weise eine Reinigung versucht werden. Durch Abkühlen seiner heißen, verdünnt-alkoholischen Lösung schied sich ein Teil aus, und durch Zusatz von Wasser zur abgossenen Lösung, Erwärmen bis zum Eintritt der Lösung des Ausgeschiedenen, Abkühlen und öftere Wiederholung dieses Vorganges konnten mehrere Fraktionen erhalten werden, von denen die erste bei $150-160^{\circ}$ schmolz, die übrigen hingegen zwischen 80 und 100° .

Um die in Alkohol leicht löslichen Fraktionen in eine Form zu bringen, in der sie leicht getrocknet und analysiert werden können, wurde jede in Alkohol gelöst und durch Eingießen in viel Wasser wieder ausgeschieden. Diese Ausscheidungen sind immer kolloid und gehen milchig durch das Filter; erst nach Zusatz von etwas Steinsalzlösung gelingt es, eine flockige Fällung zu erhalten, welche abgesaugt, vollends mit Wasser gewaschen und im Vacuum getrocknet werden kann. Die drei letzten, in Alkohol am leichtesten löslichen Fraktionen zeigten danach folgende Zusammensetzung;

82,51%	83,63%	84,11% C
8,26%	8,55%	8,74% H

Die in Alkohol am schwersten lösliche 1. Fraktion erwies sich als in Petroläther völlig unlöslich und zeigte, in konzentrierter Schwefelsäure gelöst, einen auffallenden bräunlichen, nicht roten, Farbenton, während die übrigen Fraktionen die typische Schwefelsäurereaktion zeigten und sich als zum bei weitem größten Teile in Petroläther löslich erwiesen. Eine weitere Reinigung konnte daher so durchgeführt werden, daß sowohl die besprochenen Fraktionen, als auch bei späteren Darstellungen der Rückstand der ätherischen Lösung in wenig Alkohol gelöst, im Scheidetrichter mit Petroläther (Siedepunkt 30—50°) versetzt und wiederholt mit viel Wasser ausgeschüttelt wurde. Dabei schieden sich die in Alkohol schwer und in Petroläther unlöslichen Beimengungen ab, und der die typische Schwefelsäurefluoreszenzreaktion bedingende Körper blieb allein im Petroläther in Lösung. Der Rückstand nach dem Abdestillieren des Petroläthers wurde wieder in Alkohol gelöst, in Wasser gegossen, durch Zusatz von Steinsalzlösung ausgeflockt, abgesaugt, gewaschen und über Schwefelsäure und Paraffin getrocknet und im automatischen Verbrennungssofen verbrannt.

1. 0,1630 g Substanz lieferten	0,1260 g H ₂ O	und 0,5170 g CO ₂
2. 0,1467 „ „ „	0,1132 „ „ „	0,4646 „ „
3. 0,1578 „ „ „	0,1227 „ „ „	0,4992 „ „
4. 0,1832 „ „ „	0,1407 „ „ „	0,5792 „ „
5. 0,1597 „ „ „	0,1264 „ „ „	0,5060 „ „
6. 0,1653 „ „ „	0,1282 „ „ „	0,5204 „ „

In 100 Teilen:						
	1.	2.	3.	4.	5.	6.
C	86,50	86,37	86,27	86,23	86,43	85,88
H	8,65	8,63	8,69	8,59	8,86	8,68

Berechnet für



C 86,69%

H 8,49%



86,46%

8,52%

Die gefundenen Zahlen lassen den Schluß ziehen, daß diese Präparate ihrer Hauptmenge nach als einheitlich anzusehen sind, und daß ihnen die wahrscheinliche Formel $C_{24}H_{28}O$ zukommt. Neben dieser käme auch die Formel $C_{23}H_{27}O$ in Betracht.

Zugunsten der einfachen Formel entscheiden zwei Molekulargewichtsbestimmungen, von denen die eine nach dem kryoskopischen Verfahren mit Benzol als Lösungsmittel, die andere nach dem ebullioskopischen Verfahren mit Äther als Lösungsmittel ausgeführt wurden.

Benzol. G. = 9,95 g

Substanzmenge	Δ	$M = \frac{100 \cdot g \cdot K}{(G + g) \Delta}$
g		
0,207	0,283	367
0,354	0,488	359

Äther. G. = 8,70 g

Substanzmenge	Δ	$M = \frac{100 \cdot g \cdot K}{(G + g) \Delta}$
g		
0,120	0,080	359
0,306	0,192	373

Für die Formel $C_{24}H_{28}O$ ergibt die Rechnung ein Molekulargewicht von 332.

Dieser Körper, den ich aus Gründen, die später angeführt werden sollen, Dehydrocholon nennen will, zeigt folgende Eigenschaften: Er ist leicht löslich in Alkohol, Äther, Benzol, Chloroform, Petroläther, Eisessig; unlöslich hingegen in Wasser, Alkalien und verdünnten Mineralsäuren. Im Kapillarrohr erhitzt, schmilzt er zwischen 90 und 100° zu einem braunen, durchsichtigen Tropfen zusammen. Seine alkoholische Lösung ist bei niedrigen Konzentrationsgraden strohgelb, und spektroskopisch zeigen solche Lösungen eine allmähliche Verdunkelung des vio-

letten Endes des Spektrums schon von der Linie B angefangen, besonders deutlich ist die Verdunkelung von der Linie G an.

Ganz verdünnte Lösungen dieses Körpers in konzentrierter Schwefelsäure erscheinen im durchfallenden Lichte gelblich-rötlich, und im auffallenden Lichte zeigen sie die schon mehrfach erwähnte prachtvolle grünliche Fluoreszenz. Vor dem Spalte des Spektroskopes untersucht, zeigen solche Lösungen einen schmalen Absorptionsstreifen über der Linie D und eine deutliche Verdunkelung des violetten Endes des Spektrums von der Linie F angefangen; etwas konzentriertere Lösungen erscheinen im durchfallenden Lichte deutlich rot und lassen, wie die spektroskopische Untersuchung zeigt, zu beiden Seiten des tiefdunklen Absorptionsstreifens bei D nur einerseits rotes, andererseits etwas grünes Licht durch. Noch konzentriertere Lösungen lassen überhaupt nur noch sichtbares rotes Licht durch.

Konzentrierte Salpetersäure wirkt schon in der Kälte, noch besser in der Wärme oxydierend auf den Körper ein. Dabei geht das Reaktionsprodukt in Lösung und läßt sich durch Zusatz von Wasser als hellgelbe, stickstoffhaltige Säure ausfällen. Die bisherigen Bestimmungen von Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Karboxyl, sowie die Ausbeute, weisen auf eine Dinitrodikarbonsäure hin. Durch Einwirkung von Ketonreagentien auf Dehydrocholon ist es mir bisher nicht gelungen, zu faßbaren Reaktionsprodukten zu kommen.

Vergleicht man die wahrscheinliche Formel dieses fluoreszierenden Körpers $C_{24}H_{28}O$ mit der Formel des Grundkohlenwasserstoffs¹⁾ der Cholsäure $C_{24}H_{48}$, aus welcher er unter Einwirkung von Schwefelsäure entstanden ist, so ergibt sich unter der Annahme, daß das einzige Sauerstoffatom des Dehydrocholons einer Ketongruppe angehört, ein Mindergehalt von 12 Wasserstoffatomen, und man gelangt unter Berücksichtigung des Umstandes, daß bei der in Rede stehenden Reaktion die Schwefelsäure als Oxydationsmittel gewirkt hat, und daß dabei ein nitrierbarer Körper entstanden ist, zu der Vermutung, daß hierbei eine hydrierte cykliche Verbindung, die Cholsäure, in eine

¹⁾ Landsteiner, Über Cholsäure, Diese Zeitschrift, Bd. XIX, S. 285 (1894).

dehydrierte cyklische Verbindung, Dehydrocholon, übergegangen ist, ähnlich wie hydroaromatische Verbindungen unter Verlust von Wasserstoffatomen in aromatische übergehen.

Wenn aber diese Anschauung zutrifft, so müssen bei dieser Reaktion einfache, wenn auch ringförmige Kohlenstoffbindungen in benzolartige Kohlenstoffbindungen übergegangen sein, die sich in optischer Beziehung ebenso wie doppelte oder Äthylenbindungen zu erkennen geben, und die Molekularrefraktion und die Molekulardispersion müßten dann größere Werte im dehydrierten Körper aufweisen, als sie die Berechnung der Summe der Atomdispersionen unter der Voraussetzung nur einfacher Kohlenstoffbindungen ergibt.

Solche Bestimmungen wurden von mir im Institut für physikalische Chemie zu Leipzig an alkoholischen Lösungen mit dem neuen Pulfrichschen Refraktometer bei Natrium- und Wasserstofflicht ausgeführt. Um ein vergleichbares Versuchsmaterial zu erhalten, bestimmte ich in zwei Versuchen die Molekularrefraktion und -dispersion der Cholsäure, und in drei weiteren Versuchen die Molekularrefraktion des Dehydrocholons; die Dispersion dieses Körpers konnte wegen der Lichtabsorption seiner Lösung im violetten Ende des Spektrums nicht mit Sicherheit bestimmt werden.

Jeder Versuch wurde in folgender Weise ausgeführt: Gewogene Mengen der getrockneten Substanz wurden in gewogenen Mengen starken Alkohols gelöst, und die Dichte der Lösung sowohl, als auch die des verwendeten Alkohols bei 20° im Ostwaldschen Pyknometer bestimmt. Sofort darauf erfolgte die Bestimmung des Brechungsexponenten dieser Lösung und dieses Alkohols für die drei Lichtarten $H\alpha$, D und $H\gamma$, und zwar entweder in zwei Versuchen bei einer Temperatur von 20°, oder nach der optischen Differenzialmethode im geteilten Trog gleichzeitig.

Aus diesen Bestimmungen wurde dann nach der Mischungsregel

$$R = R_1 \frac{p}{100} + R_2 \frac{100 - p}{100},$$

worin R , R_1 und R_2 den entsprechenden Ausdruck für $\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \cdot \frac{1}{d}$

und p den Prozentgehalt der Lösung bedeutet, der Wert von R_1 für den gelösten Stoff berechnet. Der größeren Genauigkeit wegen erfolgte die Berechnung der Ausdrücke $\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2}$ mit Benützung von Vegas 7stelligen Logarithmentafeln.¹⁾

Cholalsäure, kristallalkoholfrei.

1. Versuch.

Alkohol $d_{20} = 0,795843$		Lösung $d_{20} = 0,79998$, $p\% = 1,51207$	
Ha	60° 56' n = 1,36013	60° 35' n = 1,36206	
D	61° 40' 1,36198	61° 18' 1,36395	
Hγ	65° 31' 1,36953	65° 6' 1,37152	

2. Versuch.

Alkohol $d_{20} = 0,796229$		Lösung $d_{20} = 0,80146$, $p\% = 1,84198$	
Ha	60° 50' n = 1,36063	60° 23' n = 1,36315	
D	61° 34' 1,36252	61° 06' 1,36503	
Hγ	65° 23' 1,37015	64° 52' 1,37267	

Molekularrefraktion der Cholalsäure.

$$M \cdot \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \cdot \frac{1}{d}$$

berechnet aus dem

Berechnet für die Formel $C_{24}H_{40}O_8$, unter der Voraussetzung nur einfacher Kohlenstoffbindungen aus der Summe der Atomrefraktionen

1. Versuch	2. Versuch	
Ha 110,36	110,83	109,23
D 111,44	111,67	110,43
Hγ 113,14	112,98	111,76

Molekulardispersion der Cholalsäure

Ha: 2,78 D: 2,15 Hγ: 2,53

Dehydrocholon.

1. Versuch.

Alkohol $d_{20} = 0,795843$		Lösung $d_{20} = 0,807239$, $p\% = 4,76578$	
Ha	60° 56' n = 1,36013	59° 25' n = 1,36851	
D	61° 40' 1,36198	60° 4' 1,37067	

2. Versuch.

Alkohol $d_{20} = 0,795843$		Lösung $d_{20} = 0,799655$, $p\% = 1,61653$	
Ha	60° 56' n = 1,36013	60° 27' n = 1,36278	
D	61° 40' 1,36198	61° 10' 1,36467	

¹⁾ Über die Einzelheiten des Verfahrens und der Berechnung siehe: Nernst, Theoretische Chemie, 3. Aufl. 1900, S. 107 und 300; ferner Brühl, Zeitschrift f. physikal. Chem., Bd. VII, S. 140 (1891).

3. Versuch.

Alkohol $d_{20} = 0,796026$	Lösung $d_{20} = 0,810562$, $p\% = 5,93167$
Ha $60^{\circ} 52'$ $n = 1,36050$	$58^{\circ} 59'$ $n = 1,37094$
D $61^{\circ} 36'$ $1,36234$	$59^{\circ} 38'$ $1,37307$

Molekularrefraktion des Dehydrocholons.

$$M \cdot \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \cdot \frac{1}{d}$$

berechnet aus dem

1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch
Ha 104,59	102,44	103,89
D 106,40	103,23	105,23

$$M \cdot \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \cdot \frac{1}{d}$$

berechnet aus dem

1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch
Ha 100,05	98,44	99,82
D 102,24	99,19	101,12

a) Berechnet für die Formel $C_{24}H_{38}O$
aus der Summe der Atomrefrak-
tionen unter der Voraussetzung nur
einfacher Kohlenstoffbindungen:

89,97
91,74

b) Berechnet für die Formel $C_{28}H_{47}O$
aus der Summe der Atomrefrak-
tionen unter der Voraussetzung nur
einfacher Kohlenstoffbindungen:

86,60
88,19

Der Vergleich der theoretisch unter der Voraussetzung nur einfacher Kohlenstoffbindungen aus der Summe der Atomrefraktionen für die Cholalsäure berechneten Werte mit den aus den direkten Bestimmungen abgeleiteten ergibt eine große Übereinstimmung; die geringen Abweichungen der gefundenen Werte von den berechneten erreichen in keinem Falle den Wert der Refraktion einer Äthylbindung. Diese Übereinstimmung ist um so befriedigender, als wegen der geringen Löslichkeit ganz reiner Cholalsäure nur sehr verdünnte Lösungen verwendet werden konnten, und demgemäß auch schon kleine Beobachtungsfehler infolge der Anwendung der Mischungsregel das Resultat bedeutend beeinflußt hätten.

In demselben Sinne stimmen auch die Werte für die Molekulardispersion überein, so daß man sagen kann: Die Bestimmungen der Molekularrefraktion und -dispersion geben keinen Anhaltspunkt für die Annahme doppelter oder benzolartiger Kohlenstoffbindungen in der Cholalsäure.

Dem gegenüber verhält sich das Dehydrocholon wesentlich anders: In allen drei Versuchen sind die für die Molekularrefraktion gefundenen Werte viel größer, als die aus der Summe

der Atomrefraktionen unter der Voraussetzung nur einfacher Kohlenstoffbindungen berechneten, und trotz der Schwankungen, die diese Refraktionsüberschüsse in den einzelnen Versuchen aufweisen, sind sie durchwegs so beträchtlich, daß sie nur durch die Annahme von doppelten oder diesen optisch ganz gleichwertigen benzolartigen Bindungen erklärt werden können. Diese Refraktionsüberschüsse erreichen den Wert von mindestens sechs derartigen Doppelbindungen.

Zu ganz gleichsinnigen Ergebnissen, d. h. zu Überschüssen der beobachteten über die berechneten Werte gelangt man ebenfalls, wenn man von der Aufstellung einer Formel vollends absieht und die Berechnungen lediglich auf Grund des aus den Analysen sich ergebenden Verhältnisses von $C:H:O$ und auf Grund des direkt bestimmten Molekulargewichtes durchführt. Ferner muß noch bemerkt werden, daß auch in dem Falle, als das Dehydrocholon trotz der übereinstimmenden Analysenzahlen nicht der Hauptmenge nach einheitlich, sondern ein Gemenge von Körpern gleicher Löslichkeit sein sollte, das Vorhandensein von Refraktionsüberschüssen für die Bestandteile des Gemenges angenommen werden muß, weil die Refraktion eine additive Eigenschaft der Atome ist.

Gegen eine Erklärung dieser Refraktionsüberschüsse durch Kohlenstoffringe, die lediglich erst sekundär unter dem Einflusse der Schwefelsäure zustande gekommen sein sollten, sprechen einige andere Beobachtungen, die ich vorläufig nur kurz anführen will. Es gelingt auch auf dem Wege anderer Reaktionen, die ebenfalls zur Dehydrierung hydroaromatischer Verbindungen in Verwendung stehen, von der Cholälsäure zu Körpern zu kommen, die sich ebenso durch einen bedeutenden Mindergehalt an Wasserstoffatomen und durch die Eigenschaft auszeichnen, unter der Einwirkung kochender konzentrierter Salpetersäure gelb gefärbte, nitrierte Säuren zu liefern.

So erhält man durch Kochen von Cholälsäure in Eisessig mit wechselnden Mengen von Jod und nachträgliche Reduktion mit Zinkstaub je nach der Menge des angewandten Jods verschiedene halogenfreie Dehydrierungsprodukte, die teils noch den Charakter von Säuren an sich tragen, teils indifferente

Körper sind. Durch Einwirkung von trockenem Brom auf trockene Cholalsäure konnte ich vor einiger Zeit im Vereine mit Herrn Prof. Hugo Schrötter ein bromhaltiges Dehydrierungsprodukt erhalten, dessen Zusammensetzung annähernd durch die Formel $C_{24}H_{20}Br_8$ gekennzeichnet ist, und aus dem unter der Einwirkung von Reduktionsmitteln wohl bromärmere, aber keine halogenfreien Produkte erhalten werden konnten.

Ferner gelangt man nach dem Verfahren von Vesterberg,¹⁾ welches zur Gewinnung von Reten aus Abietinsäure geführt hat, durch Zusammenschmelzen von Schwefel mit Cholalsäure, wobei Schwefelwasserstoff entweicht, ebenfalls zu einer dehydrierten, nitrierbaren Säure.

Berücksichtigt man alle die angeführten Tatsachen, sowie auch den Umstand, daß die Cholalsäure selbst weder direkt nitrierbar ist, noch bisher bei der Oxydation faßbare aromatische Produkte geliefert hat, und das gesamte, bis heute bekannte Verhalten der Chlorsäure, so ergibt sich als wahrscheinliche Erklärung dafür die Anschauung, daß die Cholalsäure den hydrierten carbocyclischen Verbindungen angehört.

Bei dieser Gelegenheit teile ich auch noch die Ergebnisse zweier Versuche mit, die die Ermittlung der in physiologischer Beziehung kennenswerten Verbrennungswärme der Cholalsäure zum Zwecke hatten.

Die Bestimmungen wurden in der kalorimetrischen Bombe durch Verbrennung in reinem Sauerstoff bei konstantem Volumen und einem Druck von 25 Atmosphären ausgeführt, nachdem der Wasserwert des gesamten Apparates, durch Verbrennung von Naphtalin und Phthalsäureanhydrid aufs sorgfältigste bestimmt, zu nahezu völlig übereinstimmenden Werten geführt hatte.

Danach ergab sich für die Verbrennungswärme von 1 g reiner, kristallalkoholfreier Cholalsäure in

Versuch 1: 8105 cal. = 33,903 J = $33,903 \times 10^{10}$ Erg = 34,574 mkg

„ 2: 8101 „ = 33,887 J = $33,887 \times 10^{10}$ „ = 34,561 „

Mittel: 8103 cal. = 33,900 J = $33,900 \times 10^{10}$ Erg = 34,567 mkg

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVI, S. 4200 (1903).

Studien über den Blutfarbstoff.

V. vorläufige Mitteilung.

Von

H. Goldmann, J. Hetper und L. Marchlewski.¹⁾

(Der Redaktion zugegangen am 11. Mai 1905.)

Hämopyrrol ist bekanntlich nach Nencki und Zaleski²⁾ 3-Methyl-4-propylpyrrol, eine Ansicht, die zuerst auch von Küster³⁾ und seinen Mitarbeitern geteilt, später aber von ihm in Frage gestellt wurde.⁴⁾ Buraczewski und Marchlewski⁵⁾ versuchten das Problem durch synthetische Versuche zu fördern. Sie reduzierten das nach der Michael-Tissotschen Methode leicht darstellbare Methylpropyl-Maleinsäureimid und erhielten eine geringe Menge einer Substanz, die viele Eigenschaften des Hämopyrrols zeigte; unter anderen gab dasselbe bei der freiwilligen Oxydation unter dem Einfluß der Luft einen Farbstoff, der große Ähnlichkeit mit Urobilin besaß. Diese Experimente besaßen aber vorläufig nur einen qualitativen Charakter und waren daher nicht geeignet, das Problem der Konstitution des Hämopyrrols abzuschließen. In Anbetracht dieses Sachverhaltes besitzen wir eigentlich für die Ansicht, daß Hämopyrrol wirklich ein Pyrrolhomolog ist, nur zwei folgende, durchaus nicht gewichtige Stützen; nämlich die empirische Formel und die Tatsache, daß Hämopyrrol einen Fichtenspan rot färbt. Daran reihte sich dann die Entdeckung, daß Hämopyrrol mit Diazoniumverbindungen leicht reagiert, worauf Marchlewski

¹⁾ Mitgeteilt der Akademie der Wissenschaften zu Krakau in der Sitzung vom 9. Mai 1905.

²⁾ Bulletin intern. de l'Acad. des Sc. de Cracovie, 1901, S. 217.

³⁾ Ber., Bd. XXXV, S. 2948 (1902).

⁴⁾ Ber., Bd. XXXVII, S. 2470 (1904).

⁵⁾ Bull. intern. de l'Acad. des Sc. de Cracovie, 1904, S. 397.

mit Goldmann¹⁾ zuerst hingewiesen haben. Seitdem waren wir in der Lage, größere Mengen von Hämopyrrol in Arbeit zu nehmen, und die dabei erhaltenen Resultate sollen jetzt mitgeteilt werden.

Die Entdeckung, daß Pyrrol und einige seiner Homologen mit Diazoniumverbindungen reagieren, verdanken wir Fischer und Hepp.²⁾ Die Genannten fanden, daß Pyrrol in sauren Lösungen Monoazofarbstoffe, in alkalischen hingegen, bei Anwesenheit zweier Moleküle der Diazoniumverbindung, Disazofarbstoffe liefert. Sie überzeugten sich auch, daß das Diazoniumradikal mit gleicher Leichtigkeit α - wie β -Wasserstoffatome des Pyrrols substituieren kann, und es war daher höchst wahrscheinlich, daß Hämopyrrol ebenfalls leicht Azofarbstoffe liefern wird. Diese Vermutung hat sich auch bekanntlich bestätigt, nur zeigte es sich, daß die Reaktion weit komplizierter ist, als vorher angenommen wurde, daß nämlich unter den gewählten Versuchsbedingungen drei verschiedene Körper gebildet werden, von denen bis jetzt jedoch nur der in größeren Mengen und der beständigere quantitativ untersucht werden konnte.

Hämopyrrol und Benzoldiazoniumchlorid.

Hämopyrrol wurde nach der üblichen Nencki-Zaleskischen Methode durch Reduktion von Hämin mit Jodwasserstoffsäure in essigsaurer Lösung bei Anwesenheit von Jodphosphonium dargestellt. Für jedes Experiment wurden 5 g Hämin, 100 g Jodwasserstoffsäure, 100 g Eisessig und ca. 8 g Jodphosphonium angewandt. Nach vollendeter Reduktion wurde der größte Teil der Säuren neutralisiert und das gebildete Hämopyrrol mit Wasserdämpfen im Kohlensäurestrom abdestilliert. Sobald eine Probe des Destillates keine Reaktion mit HgCl_2 mehr gab, wurde das ganze Destillat mit Äther ausgeschüttelt und in dieser Weise das Hämopyrrol in Äther gelöst. Nach Ablassung der wässrigen Schicht wurde die ätherische Lösung sofort mit einer Lösung von Benzoldiazoniumchlorid durchgeschüttelt.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 415 (1905).

²⁾ Ber., Bd. XIX, S. 2251.

Letztere enthielt ein Molekül freier Salzsäure und wurde aus 50 ccm $\frac{1}{5}$ -normalsalzsaurem Anilin auf übliche Art dargestellt. Der Äther nahm dabei sofort eine rotbraune Farbe an, die nach und nach an Intensität zunahm und schließlich violett-braun erschien. Nach dem Abgießen der ätherischen Schicht bildeten sich bald am Boden des Gefäßes gelbliche Nadeln, die aber nach längerem Stehen der Flüssigkeit braunen Nadelchen Platz machten. Letztere wurden abfiltriert und sodann auf folgende Art umkristallisiert. Zunächst löste man sie in siedendem Alkohol und setzte dann etwas mit Chlorwasserstoff gesättigten Äther hinzu und schließlich ca. 2 Volumen Äther im Verhältnis zum Alkohol. Sehr bald schieden sich schöne braune, glänzende Nadelchen eines Chlorhydrates ab. Der Schmelzpunkt derselben im nichtpulverisierten Zustande liegt, wie früher angegeben, bei 241,5, im gepulverten bei 233°. Wie die unten angeführten Analysen beweisen, liegt hier das Chlorhydrat des Hämopyrrol-disazodibenzols vor.

1. a) 0,1224 g Substanz gaben 0,0789 g H_2O und 0,2908 g CO_2
 b) 0,1475 „ „ „ 0,0879 „ „ „ 0,3508 „ „
2. a) 0,1065 „ „ „ 0,0661 „ „ „ 0,2566 „ „
 b) 0,1162 „ „ „ 18,6 ccm N bei $t = 15^\circ$, $p = 738$ mm
3. 0,1181 „ „ „ 19,35 „ „ „ $t = 21^\circ$, $p = 740$ „
4. a) 0,1417 „ „ „ 0,0879 g H_2O und 0,3414 g CO_2
 b) 0,1300 „ „ „ 21,1 ccm N bei $t = 13^\circ$, $p = 746$ mm
5. a) 0,1083 „ „ „ 17,5 „ „ „ $t = 16^\circ$, $p = 746$ „
 b) 0,1101 „ „ „ 0,0723 g H_2O und 0,2650 g CO_2
6. a) 0,1925 „ „ „ 0,0688 „ AgCl
 b) 0,1304 „ „ „ 21,6 ccm N bei $t = 17^\circ$, $p = 742$ mm
 c) 0,1027 „ „ „ 0,0659 g H_2O und 0,2453 g CO_2

Die Analysen beziehen sich auf sechs verschiedene Darstellungen.

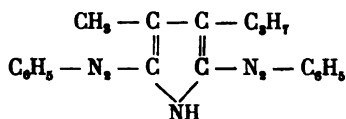
	1.		2.		3.	4.		5.		6.		
	a)	b)	a)	b)		a)	b)	a)	b)	a)	b)	c)
C	64,79	64,86	65,71	—	—	65,70	—	—	65,64	—	—	64,94
H	7,17	6,62	6,89	—	—	6,89	—	—	7,29	—	—	7,22
N	—	—	—	18,20	18,16	—	18,74	18,49	—	—	18,76	—
Cl	—	—	—	—	—	—	—	—	—	8,83	—	—

	Gefunden im Mittel:	Berechnet	
		für $C_{20}H_{22}N_2Cl$	für $C_{14}H_{18}N_2Cl$
C	65,27%	65,25%	63,75%
H	7,01%	6,03%	6,83%
N	18,47%	19,08%	15,94%
Cl	8,83%	9,64%	13,48%
	<hr/> 99,58%	<hr/> 100,00%	<hr/> 100,00%

Wie ersichtlich, stimmen die gefundenen Werte ziemlich gut auf die Formel des Hämopyrrol-disazodibenzols, nicht aber die des Hämopyrrol-monoazobenzols. Der zu hoch ausgefallene Wasserstoffwert ist wahrscheinlich durch eine ungenügende Absorption der Chlordämpfe zu erklären.

Hämopyrrol-disazodibenzol-Hydrochlorid kristallisiert in wohlausgebildeten braunen Rhomboiden, die denen des Hämins ähneln. Sie besitzen schwachen Metallglanz, wie die meisten Azofarbstoffe. In siedendem Alkohol lösen sie sich leicht mit rotvioletter Farbe, die der von Permanganatlösungen sehr ähnelt. In Äther, Benzol und Chloroform lösen sie sich nur sehr schwer. Eisessig löst sie mit Leichtigkeit; die Farbe der entstehenden Lösung ist blauer als der alkoholischen. In konzentrierter Schwefelsäure löst sich der Disazofarbstoff mit blauvioletter Farbe auf, die jedoch alsbald röter wird und den alkoholischen Lösungen gleicht. Kaliumhydrat, zu der alkoholischen Lösung des Körpers zugesetzt, verursacht einen deutlichen Farbumschlag; die Färbung ist jetzt mehr rot, der der Oxyhämoglobinslösungen analog. Wird die alkoholisch-alkalische Lösung mit Wasser versetzt, so bildet sich ein feiner Niederschlag und wird nun die Suspension mit Äther ausgeschüttelt, so geht der Farbstoff in diesen mit prächtig roter Farbe über. Nach dem Abdestillieren des Äthers hinterbleibt eine glänzende rote Masse, die in allen organischen Lösungsmitteln äußerst leicht löslich ist. Aus verdünntem Alkohol kann man den freien Azofarbstoff kristallisieren. Seine ätherische Lösung mit verdünnter Salzsäure geschüttelt gibt sofort eine kristallinische Abscheidung des Chlorhydrates. Quantitativ konnten wir den freien Farbstoff Mangels an Material wegen noch nicht untersuchen.

Was die Konstitution des freien Azofarbstoffes anbelangt, so kann man dieselbe wie folgt ausdrücken:



wobei man aber immer darauf bedacht sein muß, daß es noch nicht bewiesen ist, daß Hämopyrrol Methyl-propylpyrrol und nicht ein anderes Homolog des Pyrrols ist. Ebensowenig ist es bewiesen, daß beide Akygruppen (wenn wirklich zwei derselben anzunehmen sind) in der β -Stellung vorhanden sind. Die Leichtigkeit, mit der Hämopyrrol einen Disazofarbstoff liefert, ist jedoch sehr bezeichnend, vielleicht steht dieselbe in einem Zusammenhang mit der Konstitution desselben und es wäre sicherlich interessant, bekannte Pyrrolhomologe, mit zwei Akygruppen, auf die Fähigkeit, Disazofarbstoffe in saurer Lösung zu bilden, zu prüfen.

Hämopyrrol-disazodibenzol wird durch Wasserstoff in statu nascendi leicht reduziert; es entsteht eine beständige farblose Lösung des Reduktionsproduktes. Eine nähere Untersuchung derselben konnten wir leider nicht durchführen, die uns zur Verfügung stehende Materialmenge war hierfür viel zu klein.

Die spektroskopischen Eigenschaften dieses neuen Hämopyrrolabkömmlings sind nicht besonders interessant. Der freie Disazofarbstoff, in organischen Solventien gelöst, verursacht im Spektrum zwei Bänder, deren Lage durch folgende Wellenlängen charakterisiert ist:

Band 1: λ 551 — λ — 532

„ 2: λ 517 — λ — 495

Das Hydrochlorid in Alkohol gelöst verursacht nur ein Band, welches nicht gut begrenzt ist und auf der Thalliumlinie zu liegen kommt.

Im Ultraviolett verursacht weder der freie Farbstoff noch seine Salze charakteristische Bänder; nur eine sogenannte ziemlich starke Endabsorption ist zu bemerken, die sich aber auch bei weitgehender Verdünnung in Bänder nicht auflösen

läßt. Die Untersuchung dieser Verhältnisse geschah auf photographischem Wege, bei Anwendung von Iceland-Spatt-Prisma und Quarzlinsen.

Von Interesse ist, daß Hämopyrrol-disazodibenzol mit Salzen einiger Metalle salzartige Verbindungen bilden kann, was bis jetzt nur auf spektroskopischem Wege ausfindig gemacht wurde. Setzt man zu der alkoholischen Lösung des Hämopyrrol-disazodibenzols eine Lösung von Zinkacetat in 50% igem Alkohol, so bemerkt man einen Farbumschlag; die ursprüngliche rot-violette Lösung wird ganz bedeutend blauer und man sieht nun zwei Absorptionsbänder, deren Lage etwa den folgenden Wellenlängen entspricht:

1. λ — 607 — 577; 2. λ — 563 — 538.

Analoge Verbindungen wurden bekanntlich auch von den drei bekannten Porphyrinen gebildet. Die Zinkverbindungen haben ganz andere Spektren als die alkalischen Lösungen dieser Substanzen und es erscheint daher der Schluß gerechtfertigt, daß die Konstitution dieser zwei Reihen von Metallverbindungen verschieden ist. Dieser Schluß wird noch durch die Beobachtung erhärtet, daß Dimethylhämatoporphin, welches keine freien Hydroxylgruppen mehr enthält, noch imstande ist, wohl charakteristische Verbindungen mit Zink oder Kupfersalzen zu bilden. Diese Verbindungen müssen in diesem Falle dank der Anwesenheit von Imidgruppen zustande kommen, und diese Annahme wird nun durch die oben erwähnte Beobachtung am Hämopyrrol-disazofarbstoff bekräftigt.

Die Kristalle mit dem Schmelzpunkt 233° sind, wie bereits eingangs erwähnt, nicht das einzige Reaktionsprodukt, welches isoliert werden kann; ihrer Bildung geht die Entstehung gelber Kristalle voran, welche sehr wahrscheinlich den Monazofarbstoff vorstellen, welcher mit dem in Äther gelösten Benzoldiazoniumchlorid den Disazofarbstoff liefert. Wir bemerkten aber noch einen dritten, schön kristallinen Körper, der entweder ein Oxydationsprodukt des Hämopyrrol-disazodibenzols ist, oder aber von einem anderen Pyrrolderivat her stammt, der neben dem eigentlichen Hämopyrrol bei der Destillation des Reduktionsgemisches das Hämin mit Wasserdämpfen übergeht. Man

gewinnt ihn aus den Mutterlaugen des Disazofarbstoffs, die eine geringe Menge eines prächtigen, in Nadeln kristallisierenden Körpers absetzen; dieselben erscheinen kupferrot, besitzen starken Metallglanz und lösen sich äußerst schwer mit blauer Farbe in Alkohol, Äther oder Chloroform. Diese Schwerlöslichkeit, aber trotzdem Abscheidung erst in den Mutterlaugen, scheint dafür zu sprechen, daß die erstere oben angeführte Annahme bezüglich der Natur dieses Körpers wahrscheinlich ist.

Hämopyrrol und Toluoldiazoniumchlorid.

Hämopyrrol-disazoditoluol wird in ganz analoger Weise erhalten wie die entsprechende Benzolverbindung. Auch in diesem Falle beobachteten wir die Bildung der vergänglichen gelben Kristalle und die Entstehung geringer Mengen des kupferroten Körpers. Das Hydrochlorid, welches dunkelbraune, glänzende Nadeln vorstellt, schmilzt bei 254° . Seine Lösungen sind etwas blauer als die des Benzolderivates. Durch Alkalizusatz wird der freie, in organischen Solventien leicht lösliche Farbstoff gewonnen. Die Lösung in konzentrierter Schwefelsäure ist anfangs blau, wird aber mit der Zeit rotviolett. Die spektroskopischen Eigenschaften unterscheiden sich wenig von denen des oben besprochenen Benzolderivates.

Analyse:

0,1125 g Substanz gaben 17,8 ccm N bei $t = 20^{\circ}$, $p = 744$ mm

Gefunden: Berechnet für $C_{22}H_{20}N_2Cl$:

N = 17,72% 17,69%

Es sei noch erwähnt, daß 15 g Hämin ca. 0,3 g des reinen Farbstoffchlorids liefern.

Die Entdeckung der Azoverbindungen des Hämopyrrols wird die Identifizierung synthetischer Produkte, die als Hämopyrrol angesehen werden, sehr erleichtern. Der eine von uns wird mit J. Buraczewski prüfen, wie sich das von ihnen durch Reduktion des Methyl-propyl-Maleinsäureimids erhaltene Pyrrolhomolog Diazoniumverbindungen gegenüber verhalten wird.

Krakau, im Mai 1905.

Zur Bestimmung der Glukuronsäure.

Von
Carl Neuberg.

(Der Redaktion zugegangen am 16. Mai 1905.)

Unter dem gleichlautenden Titel knüpft im letzten Heft dieser Zeitschrift (S. 388) B. Tollens einige Bemerkungen an eine frühere Mitteilung von mir und Neimann¹⁾ über die «quantitative Bestimmung gepaarter Glukuronsäuren». Tollens wendet sich gegen den Passus unserer Arbeit, daß «die gepaarten Glukuronsäuren bei der Salzsäuredestillation wechselnde und durchaus nicht die theoretischen Mengen Furfurol geben».

Unsere Behauptung stützt sich auf die bisherigen Angaben in der Litteratur. Möglicherweise werden die Furfurolbestimmungen viel genauer durch Anwendung der vervollkommeneten Methodik, die Tollens und seine Mitarbeiter inzwischen für die Pentosen ausgearbeitet haben. Früher war gefunden für:

Glukuronsäureanhydrid	15,23—17,23%	Furfurol
Euxanthinsäure	6,16— 7,15%	>
Urochloralsäure	9,90—10,30%	>
Urobtylchloralsaures Kalium	8,74—10,27%	>

Dem gegenüber haben wir die von der Theorie für Furfurol verlangten Werte berechnet:

Glukuronsäureanhydrid	54,54%
Euxanthinsäure	23,76%
Urochloralsäure	29,48%
Urobtylchloralsaures Kalium	24,52%

Diese Gegenüberstellung zeigt, daß die Abweichungen von der Theorie zum Teil erheblich sind, wohl zu bedeutend, um die aus freiem Glukuronsäureanhydrid erhaltene Furfurolausbeute von 17,23% als Grundlage für die vorgenommene Umrechnung zu wählen.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 127 (1905).

Aber auch mit dieser Umrechnung bleibt z. B. der für Euxanthinsäure mitgeteilte Wert von 35,7% Glukuronsäurelaktone gegen die Theorie — der verlangte Wert $43,8 = 100$ gesetzt — um ca. 18,5% zurück, während die Zahl 59,6 für urobetylchloralsäures Kalium 132,7% der Theorie ergibt.

Wir haben ausdrücklich die Genauigkeit unserer Zuckersäuremethode nur für die physiologisch besonders wichtige Phenolglukuronsäure¹⁾ betont, und damit kommen wir zu dem Kardinalpunkt.

Die Brauchbarkeit der Furfurolmethode für eine angenäherte Bestimmung²⁾ der in gepaarten Glukuronsäuren enthaltenen Menge Glukuronsäure mag man ohne Einschränkung zugeben, sie kann sich, wie Tollens selbst sagt, immer nur auf die im reinen Zustande abgeschiedenen gepaarten Glukuronsäuren beziehen. Zur quantitativen Bestimmung der letzteren genügt es aber, sie zu wägen, es bedarf dazu keiner Furfuroldestillation. Unsere Versuche sind, wie wir S. 131 ausdrücklich hervorheben, unternommen, um ein für die Harnanalyse brauchbares Verfahren auszuarbeiten oder für physiologische Bedingungen, unter denen gepaarte Glukuronsäuren neben Pentosanen und pentosehaltigen Nucleoproteiden vorkommen. Hier ist, wie Tollens selbst zugibt, seine Methode nicht anwendbar.

Eine auch nur angenähert quantitative Isolierung der gepaarten Glukuronsäuren in Substanz ist in der physiologischen Praxis unmöglich, hier bedarf man gerade eines von dieser Voraussetzung freien Verfahrens. Ein solches haben wir in dem für die Pathologie wichtigsten Fall, bei der Phenolglukuronsäure, gefunden.

¹⁾ Auch bei Mentholglukuronsäure haben wir inzwischen ein befriedigendes Resultat erzielt.

²⁾ Für vergleichende Zwecke haben wir an anderer Stelle die Brauchbarkeit der bei den Pentosanen hundertfältig erprobten Tollensschen Methode ausdrücklich auch für die Glukuronsäure zugegeben; siehe Neuberg und Neimann, Zeitschrift des Vereins der deutschen Zuckerindustrie, Bd. LV, S. 423.

Über die Eiweißverdauung im Magen.

Von

Ludwig Tobler.

(Aus der Kinderklinik zu Heidelberg. Direktor: Prof. O. Vierordt.)

(Der Redaktion zugegangen am 20. Mai 1905.)

Die Unzahl der Arbeiten, die sich um die experimentelle und klinische Pathologie der Magenfunktion bemühen, führen uns die schwachen Fundamente, auf denen unentwegt weitergebaut wird, immer wieder vor Augen. Denn unser Wissen über die Physiologie der Verdauung ist noch voller Lücken. Wir kennen nachgerade eine ansehnliche Reihe von Dingen, die hierbei geschehen können, unter Bedingungen, die wir zwar beliebig zu wählen, aber kaum je physiologischem Geschehen gleichzugestalten vermögen; was in Wirklichkeit vorgeht, schließen wir bloß indirekt. Und es ist doch sehr wahrscheinlich, daß das Gesamtbild vom Verdauungsprozeß, das wir aus Detailkenntnissen über die motorische und sekretorische Funktion des Magens konstruieren, arge Mängel und Fehler aufweist, und eine noch so geringfügige Bereicherung unseres Wissens über die Physiologie der Verdauung ist häufig imstande, eine Menge auf ungenügender Basis aufgebauter Arbeit hinfällig zu machen.

Nahezu vollständig versagen unsere Kenntnisse, sowie nach quantitativen Begriffen gefragt wird. Speziell ist über das tatsächliche Endergebnis der Magenarbeit so gut wie nichts Zuverlässiges bekannt. Vielleicht deshalb und ermutigt durch Mitteilungen der Chirurgen über günstige funktionelle Resultate nach ausgedehnten Magenresektionen neigen wir eher dazu, die Wichtigkeit der Magenfunktion zu unterschätzen und das Organ vorwiegend als Nahrungsreservoir zu betrachten, das bei entsprechend geregelter Nahrungszufuhr oder eventuell durch Ausweitung des nächstfolgenden Darmabschnittes leicht entbehrlich werde. Und doch können wir uns kaum vorstellen, daß eine so komplizierte und eigenartige Organisation, als die wir den

Magen immer mehr kennen lernen, eine bloß nebensächliche Rolle im Haushalt des Organismus zu spielen berufen und ohne weiteres entbehrlich sei.

Ich habe versucht, im Tierexperiment einige genauere Anschauungen über die mechanische und chemische Gesamtarbeit des Magens zu gewinnen, unter Versuchsbedingungen, die der physiologischen Norm so nahe als immer möglich kommen sollten; daß wir von ideal zu fordernden Versuchsbedingungen dabei noch immer eine ganze Strecke entfernt bleiben würden, war mir von vornherein klar. Es sind nur ganz verschwindend wenige Spezialfragen, die sich am vollständig normalen Menschen oder Tier ohne jeden größeren Eingriff untersuchen lassen, z. B. das Resorptionsvermögen für gewisse, im Harn oder Speichel nachweisbare Drogen oder die motorische Leistungsfähigkeit an Hand derselben Methode mit Stoffen, die erst nach ihrer Weiterbeförderung in den Darm zur Resorption und Ausscheidung gelangen. Diesen mit vielen Fehlerquellen behafteten Methoden schließt sich als letzte die Sahlische Desmoidreaktion¹⁾ an, die auf der ausschließlichen Fähigkeit des Magens, ungekochtes Bindegewebe zu verdauen, beruht. Um einige wenige die Motilität betreffende Details hat uns außerdem das Röntgenverfahren bereichert (s. u.).

Die große Mehrzahl der bisherigen Untersuchungen über Magenverdauung sind mit Hilfe der Schlundsonde gewonnen worden. Kam für Untersuchungen am Menschen von vornherein kaum eine andere Methode in Betracht, so erschien auch für das Experiment am Tiere der Eingriff als der die physiologischen Vorgänge am wenigsten beeinträchtigende. Allein auch diese Illusion haben neuere Ergebnisse der Physiologie zerstört und zugleich die Erklärung für die von fast allen Autoren beklagte Unzuverlässigkeit und «Launenhaftigkeit» der Schlundsondenresultate erbracht.

Die außerordentlich schönen Untersuchungen von Grütz-

¹⁾ Sahli, Über Prüfung des Magenchemismus unter natürlichen Verhältnissen usw. Korrespondenzblatt f. Schweizer. Ärzte, Bd. XXXV, H. 8, S. 241 (1905).

ner,¹⁾ der an verschiedene Tierarten (Frösche, Ratten, Kaninchen, Hunde) verschiedenfarbiges Futter nacheinander verabreichte und den Mageninhalt auf Gefrierschnitten untersuchte, haben gelehrt, daß der breiige oder dickliche Mageninhalt zu jeder Zeit der Verdauung, weit entfernt davon, ein homogenes Gemisch der verschiedenen Ingesta unter sich und mit den Verdauungssäften darzustellen, vielmehr in gesetzmäßiger und sehr wunderbarer Weise geschichtet ist und bleibt und nur der Mageninnenfläche entlang dem Prozeß der peptischen Verdauung unterliegt, während im Inneren des Speisebreies derzeit die amylotische Verdauung durch den mitverschluckten Speichel fortschreitet, für die wir nach unseren bisherigen Vorstellungen immer eine durchaus ungenügend scheinende Zeit zur Verfügung hatten. Nun kommt dazu die von Grützner für den Frosch- und Rattenmagen nachgewiesene und für die höheren Tiergattungen und den Menschen schon von vornherein durch anatomische Befunde wahrscheinlich erscheinende Tatsache einer ganz verschiedenartigen sekretorischen und funktionellen Bedeutung der einzelnen Teilstücke der Magenschleimhaut. Grützner hält dieselbe für so wesentlich, daß er sich bei der Zusammenfassung seiner Ergebnisse dahin äußert, es gehe streng genommen in jedem Abschnitt des Magens etwas anderes vor, sowohl sekretorisch wie motorisch, und die Zusammensetzung des Inhalts sei nirgends gleich. Wenn dem so ist, so kann es nicht wundernehmen, daß die in diese wunderbare Ordnung hineinfahrende Sonde verschiedene und widersprechende Dinge zutage fördert. Ein mindestens ebenso gewichtiger Umstand kommt weiterhin dazu: die Untersuchungen von Hirsch,²⁾ Moritz,³⁾ v. Mering⁴⁾ u. a. haben ergeben,

¹⁾ P. Grützner, Beitrag zum Mechanismus der Magenverdauung. Archiv f. d. gesamte Physiologie (Pflüger), Bd. CVI, S. 463 (1905).

²⁾ A. Hirsch, Beiträge zur motor. Funktion des Magens beim Hunde. Zentralblatt f. klin. Medizin, 1892, Nr. XLVII, S. 993.

³⁾ Moritz, Studien über die motor. Tätigkeit des Magens. Zeitschrift f. Biologie, Bd. XLII (1901); siehe auch: Verhandlungen d. Gesellschaft d. Naturforscher u. Ärzte, Nürnberg 1893 und Wien 1894 und Münchener med. Wochenschrift, 1895, Nr. XL.

⁴⁾ v. Mering, Zur Funktion des Magens, XV. Kongreß f. innere Medizin, Berlin 1897 und XXII. Kongreß f. innere Medizin, Wiesbaden 1893.

daß nahezu gleichzeitig mit dem Beginn der Magenverdauung die Fortschaffung der Verdauungsprodukte einsetzt. Wir werden also durch die Schlundsonde kaum je über die Qualität der Endprodukte, geschweige denn über ihre Quantität etwas aussagen lernen.

Dieselben Bedenken werden gegen alle Ergebnisse laut, die an Menschen und Tieren mit Hilfe der Magenfistel gewonnen wurden. Aber es kommt als schwerwiegender Einwand dazu, daß der durch eine Fistel geschädigte Magen keinesfalls mehr physiologische Zustände repräsentieren kann, selbst dann nicht, wenn es gelingt, so operierte Hunde dauernd am Leben zu erhalten. Ich konnte an einem meiner Versuchshunde, der außer einer Duodenal- eine Magenfistel trug und sich im übrigen sehr gut hielt, nachweisen, daß insbesondere die Motilität des Magens doch wesentlich gelitten hatte. Ob die angelegte Fistel im eigentlichen Körper des Magens oder nahe am Pylorus gesetzt wurde, scheint mir gegenüber unserem prinzipiellen Bedenken ziemlich irrelevant.

Um das Entweichen von Verdauungsprodukten nach dem Darm zu verhindern, haben eine Anzahl Autoren von einer im Pylorusteil des Magens liegenden Fistel aus den Magen durch einen in den Anfangsteil des Duodenums vorgeschobenen und daselbst aufgeblähten Gummiballon gegen den Darm abgeschlossen. (v. Anrep,¹⁾ Brandl,²⁾ Segall.³⁾) Dies gelingt leicht und vollständig und dient recht gut zu Beobachtungen über die Resorptionsfähigkeit des Magens; über seine Resorptionstätigkeit unter physiologischen Bedingungen sagen sie nichts aus, und ebensowenig ist die Methode zu quantitativen Verdauungsversuchen zu verwerten, gerade deshalb weil die normale und für den weiteren Fortgang des Verdauungsprozesses höchst bedeutsame Abfuhr der gebildeten Verdauungsprodukte nach dem Darm aufgehoben

¹⁾ v. Anrep, Archiv f. Anatom. u. Physiolog. (phys. Abteilung), 1881, S. 504.

²⁾ Brandl, Zeitschrift f. Biologie, Bd. XXIX, S. 277 (1892).

³⁾ Segall, Die Resorption des Zuckers im Magen. Inauguraldissert. München, 1888.

ist. Dasselbe mehr theoretische Interesse kommt aus demselben Grunde den Resorptions- und Verdauungsversuchen bei intaktem Magen, aber abgebundenem Pylorus zu (Tappeiner¹⁾ und Meade-Smith²⁾) und ebenso den Verdauungsversuchen von Zunz,³⁾ der den Magen sowohl nach dem Darm wie an der Cardia abschloß und von unten her durch einen durchbohrten Pfropfen füllte.

Gar nicht beeinträchtigt wurde die Magentätigkeit in anderen, von demselben Autor ausgeführten Versuchen über die Magenverdauung des Fleisches. Zunz⁴⁾ verfütterte Fleisch an eine größere Anzahl Hunde, tötete dieselben nach verschieden langer Verdauungszeit und untersuchte den Inhalt des post mortem abgebundenen Magens. Es ist klar, daß auf diese Weise nur Beobachtungen über den Mageninhalt zu verschiedenen Zeiten der Verdauung ausgesagt werden können, nichts aber über das Endprodukt der Magenverdauung, das längst den Magen verlassen hat und im Darm einem raschen weiteren Abbau oder der Resorption verfällt.

Die einzige Methode, die einerseits den Magen in seiner Funktion unbeeinträchtigt läßt und gleichzeitig gestattet, das gesamte Endprodukt seiner Verdauungsarbeit zur Untersuchung zu gewinnen, ist offenbar die Anlegung einer hochsitzenden Duodenalfistel. Wir haben allerdings eine ganze Reihe von Bedingungen hinzuzufügen, wenn die Methodik alle berechtigten Anforderungen erfüllen soll. Ich habe versucht, unter Berücksichtigung aller dieser im folgenden zu besprechenden Punkte mit einer möglichst verbesserten Methode der Frage nach der Verdauungsarbeit des Magens näher zu treten. Die Anregung zur Bearbeitung dieses Themas verdanke ich Herrn Prof. Dr. O. Cohnheim, der mir bei meinen Untersuchungen in

¹⁾ Tappeiner, H., Über Resorption im Magen. Zeitschrift f. Biologie, Bd. XVI, S. 497 (1880).

²⁾ Meade-Smith, Die Resorption des Zuckers u. Eiweißes im Magen. Archiv f. Anatom. u. Physiolog. (phys. Abteilung), 1884, S. 481.

³⁾ C. Zunz, Über die Verdauung u. Resorption der Eiweißkörper im Magen etc. Beiträge zur chemischen Physiologie u. Pathologie, Bd. III, S. 339 (1903).

⁴⁾ l. c.

entgegenkommendster Weise mit Rat und Tat behilflich war und vor allem auch die Operation an den Versuchshunden ausführte, wofür ich ihm an dieser Stelle bestens danke.

Hirsch, v. Mering, Moritz, Pawlow¹⁾ u. a. m. haben an mit Duodenalfistel versehenen Hunden ein Fülle interessanter Beobachtungen über Menge und Beschaffenheit der austretenden Ingesta und den Mechanismus ihrer Entleerung gemacht. Der anatomische Bau des Hundes (der zu all diesen Versuchen benutzt wurde) ist in mancher Beziehung dem genannten Zwecke günstig. Das lange und sehr kräftig entwickelte Duodenum läßt sich vermöge seines langen Mesenteriums ziemlich leicht der Bauchwand nähern. Allein es gelingt schwer, die Fistel dicht hinter dem Pylorus anzulegen; ein kleines Stück Duodenum liegt auch bei starkem Heranholen, wenn man nicht Zerrungen und damit gestörte Motilität in Kauf nehmen will, proximal von der geschaffenen Öffnung. Wenn man eine Beeinträchtigung des Resultates durch Mitwirkung der Darmverdauung (speziell wegen der Frage der Resorption) ausschließen will, muß man sich vergewissern, daß dieses Duodenalstück sehr klein (5—7 cm) ausgefallen ist. Dies ist auch aus einem anderen Grunde notwendig: die Papille mit der Einmündungsstelle des Gallen- und Pankreasganges liegt in der Regel sehr weit oben im Duodenum und kann leicht in das magenwärts von der Fistel gelegene Stück fallen. Eine Vermischung des sauren Mageninhalts mit den Sekreten der beiden Unterleibsdrüsen könnte aber das Resultat sehr störend beeinflussen. Schließlich ist die Operationsmethode von einschneidender Wichtigkeit. v. Mering konnte Hunde, denen er das Duodenum durchschnitt und die Enden in die Hautwunde einnähte, nur kurze Zeit am Leben erhalten. 3—8 Tage nach der Operation erkrankten sie an einem tetanieartigen Symptomenkomplex und gingen zugrunde. Über das Befinden seiner mit wandständiger Fistel versehenen Tiere finde ich nichts Genaueres bemerkt; ebensowenig über die Art, wie die Fistel verschlossen wurde. Eine nach der von Mehringschen Methode gesetzte Fistel dauernd sicher zu schließen, dürfte

¹⁾ J. P. Pawlow, Die Arbeit der Verdauungsdrüsen. Wiesbaden 1898. S. J. Bergmann.

schwer sein. Jedenfalls machte auch Schüle¹⁾ mit seinen Hunden dieselben schlechten Erfahrungen und konnte nur einen davon länger am Leben erhalten. Alle diese Tiere können nicht als verdauungsgesund und die Ergebnisse nicht als Norm gelten.

Pawlow hat ähnliche pathologische Erscheinungen bei Hunden beobachtet, die größere Mengen Pankreassaft nach außen verloren, und hat diesen Umstand als Krankheits- und Todesursache nachgewiesen. Wie sich die Moritzschen Tiere, bei denen die Fistel mit einem Gummipelottenverband geschlossen war, verhielten, ist nicht extra erwähnt. Jedenfalls ist ein durchaus sicherer Verschuß der Fistelöffnung nach außen für die Brauchbarkeit des Versuchstieres unbedingtes Erfordernis; dies leistet in geradezu idealer Weise die Einheilung einer Metallkanüle in den Darm nach dem Vorgang von Pawlow. Von hier aus läßt sich auch sehr leicht das periphere Darmstück durch einen Ballon sicher abschließen. Für die gewöhnlichen Versuche, bei denen man lediglich beabsichtigt, die vom Magen ausgestoßenen Massen quantitativ zu gewinnen, kann man des Ballons indessen entraten. Wenn man nämlich mit Hilfe eines Reflektors den Fistelgrund und sein Verhalten bei den einzelnen Entleerungen beobachtet, so sieht man, daß das Kanülenende nicht in ein klaffendes Lumen hineinragt, sondern es legt sich infolge des intraabdominellen Druckes die gegenüberliegende Darmwand pelottenähnlich vor die Öffnung und wird durch die einzelnen durchgepreßten Flüssigkeitsschüsse nur jeweilen am gastralwärts gelegenen Kanülenrande leicht abgehoben. Bei offener Kanüle ist gar keine Möglichkeit für ein Weitergelangen des Chymus ins distale Duodenalstück vorhanden.

Nachdem wir alle diese Bedingungen bei unseren ersten Versuchen beobachtet hatten, erwiesen sich weitere Abänderungen der Technik als notwendig.

Oppenheimer²⁾ hatte schon 1889 darauf hingewiesen, daß die Entleerung des Magens eine Funktion des Darmes sein

¹⁾ Schüle, Untersuchungen über Sekretion und Motilität des normalen Magens. Zeitschrift f. klin. Medizin., Bd. XXVIII und XXIX.

²⁾ Z. Oppenheimer, Über die motor. Verrichtungen d. Magens. Deutsche med. Wochenschrift 1889, Nr. VII, S. 125.

müsse. Hirsch¹⁾ und besonders v. Mering²⁾ haben in neuerer Zeit dieser Erkenntnis präzisere Form gegeben, und Pawlow erklärte das periodische Öffnen und Schließen des Pylorus als auf einem vom Duodenum aus durch sauren oder fetthaltigen Chymus ausgelösten Chemoreflex. Dieselben Autoren haben schon darauf hingewiesen, daß die Entleerung des Magens sich anders und zwar rascher vollzieht, wenn der Mageninhalt durch die Duodenalfistel nach außen gelangt, als wenn er bei geschlossener Fistel den Darmweg weitergeht. Auch mir fiel bei meinen ersten Vorversuchen gleich die Art und Raschheit der Entleerung des verfütterten Fleisches auf, die mit manchem in Widerspruch stand. Sollten also physiologische Vorgänge möglichst genau nachgeahmt werden, so durfte das Zustandekommen der normalerweise vorhandenen Reflexe nicht aufgehoben werden. Es mußte also für einen regelmäßigen Übertritt magenverdauter Chymusmassen in den Darm gesorgt werden. Diesen Erfordernissen wurde dadurch entsprochen, daß das gesamte Verdauungsprodukt eines zwei Tage zurückliegenden Vorversuchs portionenweise nach Maßgabe der vom Magen entleerten Mengen in den abführenden Duodenalschenkel eingespritzt wurde.

Durch diese Methodik wird aber noch ein zweiter möglicherweise wichtiger Umstand berücksichtigt: nach neueren Untersuchungen sind die Magensaftmengen, die zur Bewältigung einer auch nur mittelgroßen Mahlzeit verbraucht werden, erstaunlich große; Pfaundler³⁾ berechnet sie beim Menschen für die gewöhnliche Probemahlzeit auf 600 ccm. Bei unseren Versuchen wurden für 100 g Fleisch jeweils 200–300 ccm Verdauungssekrete abgesondert. Der Organismus verausgabt damit beträchtliche Werte an Flüssigkeit und Mineralstoffen, insbesondere an Salzsäure. Es ist sehr wahrscheinlich, daß

¹⁾ A. Hirsch, Weitere Beiträge zur motor. Funktion des Magens etc. Zentralblatt f. klin. Medizin 1893, S. 377.

²⁾ l. c.

³⁾ M. Pfaundler, Über eine neue Methode zur klin. Funktionsprüfung des Magens u. deren physiologische Ergebnisse. Deutsches Archiv f. klin. Medizin, Bd. LXV, S. 255 (1904).

während einer Verdauungsperiode die in den Darm ergossene HCl rasch rückresorbiert wird und so dem Blut die Konstanz seiner Zusammensetzung sichert. Wenn dem so ist, so liegt die Vermutung nicht allzufern, daß durch größere Verluste an Magensaft nach außen die Absonderung desselben im Magen beeinträchtigt wird. Auch diesem Mißstand würde die Einspritzung analoger Chymusmengen in den Darm wirksam begegen.

Die in meinen Versuchen angewandte Methode gestaltet sich im einzelnen folgendermaßen:

Verwendet wurden drei mittelgroße Hunde im Gewicht von 7—8 kg; zwei davon wurden versuchstauglich. An denselben wurde unter den Kautelen chirurgischer Aseptik eine Duodenalfistel nach Pawlow-Dastre¹⁾ angelegt, so daß die ins Duodenum eingenähte Metallkanüle von 14 bzw. 16 mm Lumen und 45 bzw. 30 mm Länge an der rechten seitlichen Bauchwand eingeheilt wurde. Die mediane Bauchwunde wurde linear verheilt. Der Abstand vom Pyloruswulst bis zum Lumen der Kanüle betrug bei dem ersten später seziierten Hund 6 cm, die Mündung der Papille lag bei diesem Hunde dicht am distalen Rande der Kanüle. Eine Mischung des Chymus mit Galle und Pankreassaft fand also im Darm nicht statt. Dieser Hund I trug außer der Duodenalkanüle auch noch eine Magen-fistel nach Pawlow. Beim Hunde II liegen die Verhältnisse, soviel ich bei der Autopsia in vivo feststellen konnte, fast genau gleich; nur war hier die Öffnung der Drüsengänge im Gesichtsfeld des Kanülenlumens zu sehen. Beide Hunde hatten einen glatten Heilungsverlauf und wurden erst mehrere Wochen nach der Operation zu den maßgebenden Versuchen verwendet. Sie hatten beide nach der Operation tüchtig zugenommen, Freßlust und Darmentleerung waren gut, die Tiere konnten zu der Zeit als vollständig verdauungsgesund gelten.

Zum Versuch wurden die Tiere in üblicher Weise in ledernen Stützschaufen aufgestellt. Nach einiger Zeit gewöhnen sich die Hunde an den Apparat so sehr, daß sie fast während

¹⁾ Technik siehe: Ergebnisse d. Physiologie. Asher-Spiro (1902), Jahrg. I. Abt. I.

der ganzen Versuchsdauer schlafen. Dem Versuch ging 24-stündiges Hungern voraus, während dessen die Tiere im Stoffwechselkäftig aufbewahrt wurden. Vorversuche ergaben, daß unter diesen Umständen der Magen immer vollständig leer angetroffen wird, mit Ausnahme eines öfter vorhandenen Büschels verschluckter Haare. Die bei Kaninchen und Meerschweinchen beobachtete Koprophagie kommt bei Hunden nicht vor. Es ist wichtig, die Hunde während der Vorbereitungszeit nicht dursten zu lassen, da sonst die Saftsekretion leidet. Den Magen vor dem Versuch auszuspülen, halte ich für fehlerhaft, weil damit der physiologische Vorbereitungszustand gestört wird. Verfüttert wurde zum Versuche ausschließlich rohes, fett- und bindegewebefreies feingehacktes Rindfleisch, und zwar jedesmal bloß 100 g, damit die Versuchsdauer, die mit den verfütterten Mengen bekanntlich zunimmt, nicht zu stark anstieg. Das Fleisch wurde zur Entfernung der Extraktivstoffe 3 —4 Stunden lang im laufenden kalten Wasser gewaschen. Der Stickstoffgehalt wurde an drei Proben von je 1 g bestimmt. Das Futter wurde von den Tieren meist gierig in wenigen Bissen verschlungen, ein Nachschlucken von Speichel konnte ich nie beobachten. Nunmehr wurde an der geöffneten Kanüle mit Hilfe von Reflektor und Lakmuspapier das erste Auftreten sauren Mageninhalts beobachtet und sofort ein in Kältemischung gebettetes Gefäß untergeschoben. Die entleerten Massen, denen sich ab und zu etwas Galle und Pankreassaft im Glase beimengte, wurden mit dem Glasstab umgerührt und gefroren vom Rande her rasch zu einem Eisklumpen, der in gefrorenem Zustand bis zum weiteren Gebrauch aufgehoben wurde. Der Versuch wurde abgebrochen, wenn die Entleerung sistierte. Es wurden dann 50 ccm Wasser nachgegeben und mit demselben der Magen tüchtig durchgeschüttelt. Den Schluß machte eine Magenspülung mit der Schlundsonde. Beim Hunde I erfolgte einfach zum Schlusse die Eröffnung der Magenfistel, die dann die Leere des Magens nachwies.

Das so gewonnene Verdauungsprodukt wurde nun entweder zur chemischen Untersuchung verwandt oder in Kältemischung gefroren aufbewahrt und beim nächsten Versuch zur Injektion

ins distale Darmstück gebraucht. Bei diesen kombinierten Hauptversuchen (B) war die Methodik zunächst dieselbe wie in den einfachen Vorversuchen. Beim ersten Auftreten sauren Mageninhalts in der Duodenalfistel jedoch wurde ein nach dem Prinzip der Tamponkanüle mit einem Ballon aus Kondongummi armierter Nelaton-Katheder in den abführenden Duodenalschenkel eingeführt und daselbst nicht zu weit von der Kanüle entfernt aufgebläht.

Die Aufblähung des Ballons muß mit großer Sorgfalt und Vorsicht geschehen, eine Schwierigkeit, mit der wir in langwierigen Vorversuchen zu kämpfen hatten. Schon die bloße Berührung der Duodenalschleimhaut durch den eingeführten Ballon wirkt zunächst genau wie die Einspritzung sauren Mageninhaltes für einige Minuten unterbrechend auf die Magenentleerung. Bläht man den Ballon zu stark auf, so kann die Magenentleerung jedoch bis zu einer halben Stunde sistieren und überhaupt nicht mehr regelmäßig in Gang kommen. Es genügt aber eine verhältnismäßig geringe Ballonfüllung zum vollständigen Abschlusse des Darmes, wovon wir uns durch Einspritzung gefärbter Flüssigkeit überzeugen konnten. Zur Füllung des Ballons darf nicht, wie es bisher immer geschah, Wasser verwendet werden; der Ballon, der auf diese Art ein ganz erhebliches Gewicht erreicht, wird alsdann offenbar als lästiger Fremdkörper empfunden, der Hund wird oft unruhig, die Magenentleerung wird ganz unregelmäßig oder sistiert und mit dem Spiegel sieht man im Grunde der Kanüle peristaltische Darmbewegungen offenbar um seine Weiterschaffung vergeblich bemüht.

Hat man den Ballon unter diesen Kautelen eingeführt und sich nach wenigen Minuten vom geregelten Fortgang der Magenentleerung überzeugt, so schreitet man nun dazu, das aufgetaute und zur Befreiung von gröberen Stücken durch weitmaschige Gaze gegebene Verdauungsprodukt des Vorversuches portionenweis auf Körpertemperatur aufgewärmt nach Maßgabe des austretenden Mageninhaltes durch den Katheder hinter den Ballon in den Darm zu spritzen. Es empfiehlt sich, die Masse durch Methylenblau zu färben und sich häufig zu vergewissern, daß ein Rückfluß in die Kanüle nicht stattfindet.

Wollte man den physiologischen Vorgang in vollständig exakter Weise nachahmen, so müßte man jedem einzelnen entleerten Schuß eine gleichgroße Injektion ins Duodenum entsprechen lassen. Soweit zu gehen, ist aus äußeren Gründen kaum tunlich. Wir begnügten uns deshalb damit, nach bestimmten Zeiten (5—15 Minuten) oder nach einer abgezählten Anzahl einzelner Schüsse (15—20) eine annähernd entsprechende Menge zu injizieren. Diese Modifikation halten wir für ziemlich unwesentlich für das Endergebnis. Es tritt auf eine solche Injektion regelmäßig prompt der reflektorische Pyloruschluß ein und dauert je nach der Verdauungsperiode 3—10 Minuten an. Wir denken uns, daß durch das häufigere Eintreten kleinerer Mengen der Reflex zwar häufiger, aber von kürzerer Dauer ausgelöst würde, wofür wir einzelne Anhaltspunkte gewonnen haben, und glauben, daß so das Resultat auf die Verdauungsleistung des Magens ungefähr gleich ausfällt.

Ich versuche im folgenden die typisch wiederkehrenden Beobachtungen mechanisch-physikalischer Art, die sich bei unserer Versuchsanordnung ergeben, aus einer Reihe von gleichartigen Versuchen zusammenzustellen, um einige Schlüsse daraus zu ziehen. Ich beziehe mich hierbei, wo nichts anderes bemerkt wird, bloß auf die am Hunde II (ohne Magenfistel) gewonnenen Resultate. Der Versuch verläuft, wie schon bemerkt, verschieden, je nachdem Mageninhalt in den Darm gelangt oder nicht.

A. Versuche ohne Einspritzung.

(Versuchsanordnung, wie oben geschildert.)

Beim Öffnen der Kanüle entleert sich zunächst etwas in ihr aufgesammelte Galle. Dann folgt langsam in einzelnen Tropfen alkalischer klarer Saft. 5—12 Minuten (Mittel 8 Minuten) nach Beginn der Fütterung (Dauer derselben bis zu einer Minute) erscheinen ein paar trübe schwach sauer reagierende Tropfen und sofort darauf entleert sich im Strahl ziemlich dünnflüssiger saurer etwas fadenziehender (Speichel?) Mageninhalt; wenige Minuten später hat sich ein durchaus regelmäßiger rhythmischer Entleerungsmodus ausgebildet, der in allen Versuchen derselbe bleibt: die sauren Schüsse folgen

sich zunächst sehr rasch in regelmäßigen Abständen von 12—20 Sekunden (3—4 pro Minute). Die auf einmal entleerten Mengen mögen bis zu einem halben Kubikzentimeter, selten mehr betragen. Sie verlieren rasch ihr schleimiges Aussehen, werden vollständig dünnflüssig, leicht trüb, nahezu farblos und entleeren sich plätschernd in das Gefäß. Die Reaktion ist stark sauer, freie HCl enthält das Produkt zu keiner Zeit. Die mikroskopische Untersuchung eines Tropfens zeigt neben einzelnen Leukocyten und Fetttropfchen amorphen Detritus, etwas später auch vereinzelte Muskelfasern mit teilweise erhaltener Querstreifung. Schon sehr rasch (15—30 Minuten) beginnen die Entleerungen etwas dickflüssiger zu werden; gallertige Klümpchen unverdauten Fleisches mischen sich bei. Nach und nach nehmen Häufigkeit und Volumen der Entleerungen etwas ab. Gegen Ende der zweiten Stunde sind es fast ausschließlich dickliche Massen, die in regelmäßiger Folge in die Kanüle gewälzt werden und langsam herabgleiten. Nach $2\frac{1}{4}$ — $2\frac{1}{2}$ Stunden sistiert die Entleerung fast vollständig; nach $2\frac{1}{4}$ —3 Stunden wurde jeweilen abgebrochen, 50 ccm Wasser zu saufen gegeben und damit der Magen durchgeschüttelt. Das Wasser entleerte sich leicht getrübt sofort und in wenigen Minuten vollständig. Darauf überzeugten wir uns mit Hilfe der Schlundsonde von der Leerheit des Magens. In dem spurweise getrühten Spülwasser waren einzelne feine Faserchen und Flocken suspendiert; nur einmal fanden sich kleine Fleischbröckel dabei.

B. Versuche mit Einspritzung.

Die kombinierten Versuche beginnen zunächst genau wie die unter A beschriebenen. Nach den ersten sauren Schüssen wird der Ballon ins Duodenum eingeführt. Sofort sistiert die Entleerung aus dem Magen. Dagegen wird der gesetzte Reiz durch einen stärkeren Abfluß von Galle und Pankreassaft beantwortet; nachdem derselbe sistiert, kommt nach kurzer Zeit (4—5 Minuten) die regelmäßige Entleerung wieder in Gang. Nun wird nach je 10 bis 15 bis 20 Schüssen eine Portion des im Vorversuch gewonnenen Verdauungsproduktes eingespritzt und es sistiert nach ganz kurzer, höchstens 15 Sekunden dauernder

Latenzzeit die Magenentleerung. Statt dessen ergießt sich aus der Kanüle von links her zunächst tropfenweise klarer alkalischer Saft (Pankreas) und nach 1—2 Minuten folgen 1—2 Schüsse Galle nach. Offenbar wurde von der Duodenalschleimhaut aus die sekretorische Tätigkeit der beiden Drüsen erregt. Nun beobachtet man nach Ablauf einer kurzen Zeitspanne das erneute Auftreten dünnflüssiger saurer schußweiser Entleerungen aus dem Magen. Die Zeit, während derer die Entleerung aussetzt, ist verschieden. Sie wächst mit dem Vorrücken der Verdauungsperiode von 3 Minuten rasch auf 5—7 (1. Stunde) dann auf 10—12 Minuten. Diesen Typus hielten die einzelnen Kontrollversuche mit einer geradezu staunenswerten Regelmäßigkeit ein. Es ist mir nicht vorgekommen, daß auf eine einzige meiner vielen hundert Injektionen der Pylorusreflex ausgeblieben wäre.

Einen wesentlichen Einfluß äußerte das so modifizierte Verfahren (gegenüber demjenigen unter A) auf die physikalische Beschaffenheit des Entleerten einerseits und die Dauer des Verdauungsprozesses andererseits. Dies erscheint ja auch ohne weiteres verständlich. Der Entleerungsprozeß wird eben immer wieder unterbrochen und dadurch in die Länge gezogen. Die Zeit bis zur vollständigen Magenleere betrug bei den kombinierten Versuchen über 3—3½ Stunden. In der dadurch gewonnenen Zeit finden die wirksamen Kräfte der Magenverdauung immer wieder Zeit, neue Futterportionen zu verflüssigen und so zur Ausfuhr geeignet zu machen. Dem entsprechen denn auch die chemischen Resultate. Physikalisch äußert sich dieses Moment in der veränderten Beschaffenheit der in der Fistel erscheinenden Massen. Während nach A schon nach 20—30 Minuten dicke Bröckel unverdauten Fleisches zum Vorschein kamen, dauert es nach B 50—60 Minuten, bis die ersten etwas dicklichen Produkte zunächst regelmäßig nur mit dem ersten Schuß nach der Entleerungspause austraten. Eigentlich unverdaute grobe Bröckel kamen in diesen Versuchen überhaupt nicht zu Gesicht.

Das wesentliche Resultat unserer Beobachtungen ist also die ganz gesetzmäßige und für die ganze Verdauungs-

zeit geltende Beeinflussung und Regelung der Magenentleerung auf reflektorischem Wege vom Darne aus und die Art und Weise, wie sich dies am Verdauungsprodukte äußert. Wir hatten, gestützt auf die Beobachtungen anderer Autoren, nicht erwartet, den Verdauungsprozeß schon am Ende der Magenverdauung soweit vorgeschritten zu finden, daß die weitaus größte Menge den Darm in flüssigem und, wie sich aus der chemischen Untersuchung ergeben wird, weitgehend abgebautem Zustande erreicht.

Unsere Beobachtungen stehen im Widerspruch mit einer Anzahl bisheriger Mitteilungen. Es erklärt sich dies wohl hinreichend durch die Verschiedenheit der Technik. Nicht ohne weiteres verständlich sind die großen zeitlichen Differenzen, die für das erste Eintreten von Mageninhalt in den Darm angegeben werden. Während wir und ebenso Cahn,¹⁾ Hirsch und Cannon²⁾ bei seinen Röntgenuntersuchungen schon nach recht kurzer Zeit, 5—15 Minuten, Mageninhalt in den Darm übertreten sahen, decken sich die Beobachtungen anderer (Moritz, Schüle) zum Teil mehr mit den alten Roßbachschen Anschauungen,³⁾ nach denen der volle Magen seine Bewegungen zwar frühzeitig beginnt, aber erst nach längerer Dauer dieser Bewegungen die Eröffnung des Pylorus stattfindet. So sah Moritz in einem Falle nach Fütterung von 200 g Fleisch die Austreibung erst nach $\frac{3}{4}$ Stunden, ein andermal nach Wurst erst nach zwei Stunden beginnen. Vielleicht hat hier der mit Wasser gefüllte Ballon im Duodenum (wie oben näher beschrieben) die Motilität beeinträchtigt. Vielleicht auch waren die Versuchstiere doch infolge Flüssigkeitsverlust durch mangelhaften Schluß der Fistel geschädigt, oder sie hatten vor Beginn des Versuches zu stark gedurstet. Aus diesem letzteren Grunde mußte ich einmal einen Versuch aufgeben, der mir gerade in dieser Richtung lehrreich war: ich hatte in üblicher

¹⁾ Cahn, Die Verdauung des Fleisches im normalen Magen. Zeitschrift f. klin. Medizin, Bd. XII, S. 34.

²⁾ cit. nach Grützner, Pflügers Archiv, 1905, Bd. CVI.

³⁾ J. Roßbach, Beiträge zur Lehre von den Bewegungen des Magens. Deutsches Archiv f. klin. Medizin, Bd. XLVI, S. 296 (1890).

Weise den Hund I mit Fleisch gefüttert und zum Versuche aufgestellt, wartete aber vergeblich auf das Erscheinen des Chymus. Als nach $\frac{3}{4}$ Stunden die Entleerung noch nicht in Gang gekommen war, brach ich den Versuch ab und öffnete die Magen-fistel. Dabei fand ich die gesamte Fleischmenge in nahezu unverändertem Zustande als trockenen festen Ballen, der die Fistel nicht passierte, im Magen liegen. Nachdem das Tier befreit war, stürzte es sich auf das nächste Gefäß mit Wasser und soff gierig wohl 10 Minuten lang. In einem anderen Versuche beim Hunde II zeigte sich ebenfalls nach Beendigung eines Versuches, der auffallend wenig Volumen und viel ungelöste Massen zutage gefördert hatte, das Tier äußerst durstig.

Dasselbe, was für den Beginn der Entleerung, gilt auch für ihr Ende. Es ist bekannt, daß die Verdauungszeit mit der Größe der Mahlzeit steigt, aber nicht im selben Maße wie die Mengen. Moritz' Hund verdaute an 200 g Fleisch bei offener Fistel 6—7 Stunden, der meinige war mit 100 g nach $2\frac{1}{2}$ Stunden fertig. Doch mögen hier individuelle Schwankungen vorkommen; denn auch Zunz beobachtete sehr lange Verdauungszeiten und Schmidt sah den Magen seiner nicht operierten Hunde, die er mit 200 g Fleisch gefüttert hatte, erst nach 9—12 Stunden leer. In den ersten Stunden fand er den Mageninhalt auffallend trocken, krümelig auseinanderfallend. Auch diese Hunde hatten wohl zu lange gedurstet.

Chemischer Teil.

Es erschien uns von größtem Interesse, an die Frage der Verdauungsarbeit des Magens nunmehr auch mit quantitativen chemischen Methoden heranzutreten. Es sollte untersucht werden, bis zu welchen Stufen der Abbau der Eiweißkörper bei der Magenverdauung vorschreitet und in welchen Mengenverhältnissen diese Produkte den Magen verlassen. Dabei mußten sich gleichzeitig Ergebnisse über die physiologische Resorptionstätigkeit des Magens herausstellen.

Über diese Fragen besitzen wir bisher so gut wie keine

Angaben. Moritz¹⁾ fand, daß bei Fleischfütterung (bei offener Fistel) 58% des gereichten N in ungelöstem Zustand den Magen verlassen; auf weitere Eigenschaften wurde das Verdauungsprodukt nicht untersucht. Alle anderen Untersuchungen werden durch die zu Beginn genannten Mängel der angewandten Methodik von vornherein unserer Fragestellung nicht gerecht. Es wurden immer bloß Magenverdauungsprodukte, niemals aber das wirkliche Endprodukt bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen waren folgende:

Schmidt-Mülheim,²⁾ der als erster der Frage näher trat, fand im Magen von Hunden, die er mit Fleisch fütterte und nach verschieden langer Zeit tötete, den weitüberwiegenden Teil des N in ungelöster Form. Er trennte durch Kochen und folgendes Auspressen in Leinwand das Gelöste vom Ungelösten. Im gelösten Teil übertraf der Anteil des Peptons jederzeit beträchtlich die einfach gelösten Eiweißstoffe. Die Menge des gelösten Eiweißes plus Pepton war zu allen Zeiten im Magen fast gleich. Was hier «Pepton» genannt wird, besteht zum großen Teil aus Albumosen; andererseits sind aber auch in dem sogenannten «gelösten Eiweiß» Albumosen enthalten.

Cahn³⁾ verfütterte Fleischpulver und untersuchte mit der Schlundsonde gewonnene Proben. Er fand regelmäßig schon nach einer halben Stunde eine beträchtliche Quantität von Verdauungsprodukten gebildet und ist der Ansicht, daß beim intakten Tier der größte Teil des Eiweißes erst in den Darm tritt, nachdem es peptonisiert ist. Eine Trennung in Albumosen und tiefere Spaltungsprodukte wurde nicht gemacht.

Zunz⁴⁾ experimentierte an Hunden, die er mit Fleisch fütterte und während der Verdauung tötete. Er fand im Mageninhalt zu allen Zeiten der Verdauung weitaus den größten Teil des gelösten Eiweißes in Form von Albumosen (nur einmal

¹⁾ l. c.

²⁾ Schmidt-Mülheim, A., Archiv f. Anatom. u. Physiolog. (phys. Abteilung), 1879, S. 39.

³⁾ l. c.

⁴⁾ l. c. Außerdem: Annales de la société royale des sciences méd. et naturelles de Bruxelles. T. XIII, fasc. I (1904). (De la quantité d'albumoses contenue dans l'estomac du chien après l'ingestion de la viande).

weniger als 90^o/_o); die Albumosenmenge in einem bestimmten Moment scheint nicht von der Menge des Gefressenen abzuhängen. Ihre absolute Menge wechselt wenig, aber etwas mehr als die relative. Die Gesamtmenge der Peptone, Peptoide und Endprodukte betrug nur ausnahmsweise über 10^o/_o. Kristallinische Endprodukte fanden sich nur in verschwindenden Mengen, die auch aus dem gefütterten Fleisch stammen konnten.

Aus diesen Resultaten schließen zu wollen, daß die Magenverdauung den überwiegenden Teil des Eiweißes nicht über die Albumosenstufe abbaut, ist nicht berechtigt und wäre es selbst dann nicht, wenn die von Ewald-Gumlich¹⁾ gemachte Annahme zuträfe. Die genannten Autoren halten es für undenkbar, daß aus einem Gemisch von löslichen Substanzen (Albumosen plus Peptide) die eine vor der anderen und ohne dieselbe mechanisch entfernt werde. Nun besteht aber im Magen nach den im Anfang dieser Mitteilung dargelegten neueren Anschauungen eben nichts weniger als eine gleichmäßige Mischung. Wenn sich ergibt, daß im Mageninhalt die Albumosen, in dem vom Magen durch den Pförtner Entleerten aber die tieferen Spaltungsprodukte weitaus vorwiegen, so ist nur die eine Erklärung möglich, daß eben doch eine Sonderung der beiden Substanzen statthat. Es scheint mir durchaus wahrscheinlich, daß die große Menge der Albumosen noch mechanisch an und zwischen den halbgelösten Fleischpartikeln haftet, während von der Oberfläche, wo die Säurewirkung am stärksten ist, Eiweiß in Form von Peptonen durch die Peristaltik abgeschoben und zur Entleerung gebracht wird. Es könnten aber auch in der säurereichen pars pylorica des Magens hierher gelangte Albumosenmengen vor ihrer Ausstoßung einem weiteren Abbau unterliegen, während die große Menge erst angedauten Fleisches bekanntlich als nur oberflächlich angegriffener Kloß im Fundus ruht. Auch unter diesen Umständen würde man bei Untersuchung des gesamten Mageninhalts die höheren Stufen überwiegend finden.

¹⁾ C. A. Ewald und Gumlich, Über die Bildung von Pepton im menschlichen Magen usw. Berliner klin. Wochenschrift, Bd. XXVII, S. 1016 (1890).

Doch gehen wir zu den Ergebnissen unserer Untersuchungen über. Dieselben wurden folgendermaßen gewonnen: das hart gefrorene Verdauungsprodukt wurde gewogen, hierauf aufgetaut, sofort gekocht und zur Trennung der gelösten Eiweißkörper von den ungelösten heiß filtriert; war das Produkt stark mit Galle vermennt, so wurde der Filtrerrückstand aufgeschwemmt und mit Sodalösung neutralisiert, um etwa durch die Gallensäuren gefällte Albumosen wieder in Lösung zu bringen. Nochmaliges Filtrieren und Vereinigung der Filtrate. Nunmehr wurde der ungelöste Rückstand mit konzentrierter H_2SO_4 gekocht, bis zur nahezu vollständigen Lösung und alsdann hierin, sowie im gelösten Anteil der N-Gehalt an Proben von 10—20 ccm nach Kjeldahl bestimmt. Hierauf wurde die Gesamtmenge des gelösten Anteils oder ein abgemessener Teil davon mit ZnSO_4 in Substanz gesättigt und über Nacht stehen gelassen. Die Albumosen scheiden sich dabei entweder als braune Kruste an der Wand des Glases ab oder erscheinen als bräunlich-bröckeliger Niederschlag an der Oberfläche schwimmend und können aufs Filter gebracht werden. Dieser Rückstand wurde mit gesättigter ZnSO_4 -Lösung nachgewaschen, dann in heißem Wasser gelöst und sein N-Gehalt bestimmt. Auf getrennte Fällung der verschiedenen Albumosenfraktionen wurde als für unsere Zwecke wertlos von vornherein verzichtet. Zur Kontrolle wurde auch in einer gemessenen Menge des Filtrats die Stickstoffbestimmung ausgeführt und die Hauptmenge dann unter Zusatz von etwas H_2SO_4 mit Phosphorwolframsäure vollständig ausgefällt, der Niederschlag durch Absaugen gewonnen und mit wenig verdünnter Phosphorwolframsäure nachgewaschen. Das nunmehr restierende Filtrat enthielt in allen Fällen geringe Mengen N. Zur genaueren Untersuchung der in ihm enthaltenen N-haltigen Stoffe wurde das Filtrat eines Versuches durch kohlensauren Baryt von der Phosphorwolframsäure befreit, bei neutraler Reaktion zur Trockere eingedampft und in Wasser gelöst. Diese konzentrierte Lösung gab die Biuretreaktion deutlich. Mit Phosphorwolframsäure erhielt man einen starken Niederschlag. Demnach ist der N-Gehalt des Filtrates wohl auf der Fällung entgangenes Pepton zu beziehen.

Tabelle I.

Ver- suchs- Nr.	Ver- suchs- stier	Me- thode	Fleisch- menge g	Menge des Verdaun- ungs- produktes ^{*)}	N-Gehalt des Fleisches	Wiedergefundener N				Re- sor- biert	Vom gelösten N waren	
						im Magen- rest	als unge- löster N	als ge- löster N	im ganzen N		Albu- mosen	Pep- ton
1	I	B	100	445	3,13	0,086	0,564	1,936	2,586	0,544	0,273	1,663
2	I	B	100	415	3,235	0,161	0,598	1,675	2,434	0,801	0,602	1,873
3	II	A	100	342	3,27	—	0,842	2,115	2,957	0,313	1,266	0,849
4	II	B	100	344	2,90	0,064	0,770	1,424	2,258	0,642	0,323	1,101
5	II	B	100	286	2,90	0,029	0,597	1,401	2,027	0,873	0,243	1,158

*) Wasser abgerechnet.

NB. Unter Pepton ist die kleine N-Menge, die auf durch Phosphorwolframsäure nicht fällbare Substanz entfällt, mitgerechnet, da dieselbe auf der Fällung entgangenes Pepton entfällt (siehe S. 203).

Tabelle II.

Ver- suchs- Nr.	Von 100 g N sind				
	wieder erschienen				resorbiert
	ungelöst	gelöst	als Albumosen	als Pepton	
1	18,0	61,8	8,7	53,1	17,4
2	18,5	51,8	18,6	33,1	24,8
3	25,7	64,7	38,7	25,9	9,6
4	26,5	49,1	11,1	37,9	22,1
5	20,6	48,3	8,4	39,9	30,1

Die Ergebnisse der chemischen Analyse stellen den zahlenmäßigen Beleg für das schon durch das physikalische Resultat wahrscheinlichgewordene Verhalten dar. Die Magenverdauung leistet unter physiologischen Verhältnissen offenbar bedeutend mehr, als wir bisher anzunehmen geneigt

waren. Von dem gesamten in 100 g Fleisch zugeführten N verließen bloß 20—26% den Magen in ungelöstem Zustand.¹⁾ Der Rest von 74—80% muß bereits im Magen zu löslichen Abbauprodukten des Eiweißes umgewandelt worden sein. In der Duodenalfistel erschien allerdings niemals diese ganze N-Menge. Da im Magen nur minimale Spuren N-haltiger Substanz zurückblieben, deren Menge in Spülwasser bestimmt wurde, bleibt nur die Annahme übrig, daß der Rest der Resorption schon im Magen anheim fiel; wir werden weiterhin auf die Frage der Resorption zurückzukommen haben.

Die gelösten Eiweißkörper waren zur überwiegenden Menge schon bis zur Stufe der Peptone abgebaut. Als Albumosen verließen nur 8—11% des gesamten N, 17—23% der gelösten, wieder erschienenen Eiweißkörper den Magen. Weitaus die größte Menge des gelösten N ging nach dem Aussalzen ins Filtrat und war durch Phosphorwolframsäure fällbar. Dieser Niederschlag wurde durch Baryt und Kohlensäure von der Phosphorwolframsäure befreit, zur Trockne eingedampft, mit heißem Wasser aufgenommen und filtriert. Dieses Filtrat gab die Biuretreaktion stark und noch in einer Verdünnung von 1:10000 war dieselbe deutlich positiv, sie war bei gewöhnlicher Konzentration kochbeständig. Ebenso gab diese Peptonlösung die Millonsche Reaktion und mit Pikrinsäure einen gelblichen gelatinösen Niederschlag. Arginin war darin nicht nachweisbar. Ob den Peptonen außerdem Peptide beigemischt waren, die die Biuretreaktion nicht geben, aber keine Aminosäuren sind, geht daraus nicht hervor und läßt sich, da eine Trennungsmethode fehlt, nicht entscheiden. Die mit kohlensaurem Baryt vom ZnSO_4 befreiten Albumosen wurden ebenfalls eingedampft, mit Wasser heiß aufgenommen und filtriert. In diesem Filtrat war die Biuret- und Millonsche Reaktion stark und mit Phosphorwolframsäure entstand ein gelatinöser dicker Niederschlag. Die überwiegende Menge der Albumosen gehörte den Deuteroalbumosen an.

Von der Albumosen- und Peptonlösung sowie von

¹⁾ Die Zahl wird durch das in den Verdauungssekreten enthaltene koagulable Eiweiß außerdem etwas vergrößert.

einer ungetrennten Mischung aller gelösten Eiweißkörper wurden nunmehr Proben auf 38—39° vorgewärmt und sodann mit von einem frisch getöteten Hunde gewonnenem Erepsin und Trypsin (Darm- und Pankreasextrakt) versetzt und ins Wasserbad von 37—39° gesetzt. Dabei ergab sich, daß die Biuretreaktion schon nach kurzer Zeit an Intensität beträchtlich abnimmt, der weitere Abbau aber auch nach längerer Zeit ($1\frac{1}{4}$ St.) nicht bis zur Bildung ausschließlich abiureter Produkte fortschreitet. Es ergibt sich hieraus, daß die Verdauungsprodukte des Magens leicht weiter spaltbar sind, und es erscheint somit nicht unwahrscheinlich, daß ein Teil des Eiweißes in Form tieferer Spaltungsprodukte zur Resorption gelangt. In welcher Form die im Magen resorbierten 22—30% der N-haltigen Substanz resorbiert wurden, wissen wir nicht.

Von besonderem Interesse ist auch hier ein Vergleich zwischen den eben angeführten nach unserer kombinierten Methode gewonnenen Resultaten und denen, die bei unbehindertem Auslaufen aus der offenstehenden Kanüle gewonnen wurden. Auch da ergibt sich ein beträchtlicher Unterschied in der Verdauungsleistung. Denn unter diesen Umständen steigt nicht bloß die Quantität des ungelösten N an, sondern auch in der löslichen Komponente ist die Albumosenfraktion, das nähere Produkt stärker vertreten; zugleich sinken die auf Resorption entfallenden Werte.

Wir sehen in diesen Resultaten den Beleg dafür, daß die von Zunz, Schmidt-Mühlheim u. a. gemachten Angaben über die Zusammensetzung des Mageninhalts zu verschiedenen Perioden der Verdauung, zur Beurteilung des Endproduktes und der Gesamtleistung der Magenverdauung nicht benutzt werden dürfen.

Wir kommen nunmehr zur Frage der Resorptionsfähigkeit des Magens zurück. Unsere bisherigen Kenntnisse sagen darüber folgendes aus: Wasser wird im Magen nach v. Mering in nennenswerter Menge nicht resorbiert, Hirsch¹⁾ meint allerdings, daß bei offener Fistel angestellte

¹⁾ A. Hirsch, Zur Frage der Wasserresorption im Magen des Hundes. Zentralblatt f. klin. Medizin, 1893, S. 601.

Versuche hierüber nichts Sicheres auszusagen vermögen, weil das Wasser zu kurz im Magen verweilt. Aus wässerigen Lösungen vermag der Magen Salze, Zucker, Dextrin, Pepton etc. sowie eine Anzahl Arzneistoffe zu resorbieren. Die Resorptionsgröße wächst mit der Konzentration der Lösung. Alkohol und alkoholische Lösungen sowie Gewürze befördern die Resorption wesentlich; aus schleimigen Lösungen wird weniger gut resorbiert (v. Mering, Tappeiner, v. Anrep, Brandl, Glaeßner,¹⁾ Segall, Otto²⁾ u. a.). Zunz³⁾ wies nach, daß bei Einführung einer Albumosenlösung in den abgebundenen Magen eine Resorption N-haltiger Substanz sicher stattfindet, dieselbe ist jedoch bedeutend geringer als im Darm.

Gewinnen wir aus diesen interessanten Versuchen eine Menge Material über das, was die Magenschleimhaut unter bestimmten Versuchsbedingungen an Resorptionsarbeit eventuell zu leisten vermag, so bleibt auch hier die Frage wieder offen, was unter physiologischen Verhältnissen tatsächlich geleistet wird. Brandl fand, daß aus Lösungen, deren Konzentration die physiologisch vorkommenden Grade nicht überstieg, so gut wie nichts resorbiert wurde, und auch Moritz⁴⁾ ist der Ansicht, daß die resorptive Kraft des Magens im allgemeinen bedeutend überschätzt werde und unter den praktisch vorkommenden Bedingungen fast gleich Null sei.

Unsere Versuche ergeben mit größter Konstanz ein so beträchtliches N-Defizit zwischen dem zugeführten und dem wiedergefundenen Material, daß an der Tatsache einer Resorption innerhalb des Magens kaum zu zweifeln möglich ist. Die Werte liegen nicht nur weit außerhalb der Versuchsfehler, sondern müssen eher noch zu klein erscheinen, da die N-Menge der Nahrung noch durch den Stickstoffgehalt der zugeflossenen Verdauungssäfte vermehrt wurde.

¹⁾ R. Glaeßner, Hofmeisters Beiträge, Bd. I, S. 332 (1902).

²⁾ C. Otto, Über das Verhalten von Salzlösungen im Magen. Archiv f. experiment. Pathologie u. Therapie, Bd. LII, H. 5, S. 370 (1905).

³⁾ C. Zunz, Recherches sur la digestion pepsique et gastrique des albumoses primaires. Annales de la soc. royale des sciences méd. et naturelles de Bruxelles, T. XII, fasc. 3 (1904).

⁴⁾ Münchener med. Wochenschrift, 1898, S. 1521.

Ein Einwand läßt sich allerdings gegen unsere Resultate erheben, den ich, wenn ich ihn auch nicht für wesentlich halte, doch nicht exakt zu widerlegen vermag. Es wäre eventuell denkbar, daß die gesamte Resorption in dem 6—7 cm langen Duodenalstück, das der Kanüle vorgelagert ist, stattfinden könnte. Man wird zugeben, daß die Länge des tierischen Darmes in ihrer teleologischen Bedeutung unverständlich würde, wenn ein so verschwindend kleines Stück davon eine so erstaunlich große Leistungsfähigkeit besäße; man bedenke überdies, daß die vom Magen ausgestoßenen Massen hier nicht etwa liegen bleiben, sondern in einem Schuß bis zur Kanüle gelangen, und endlich handelt es sich um ein Darmstück, innerhalb dessen der Prozeß der tryptischen Verdauung noch gar nicht eingesetzt hat und das also funktionell, wenn auch nicht anatomisch fast mit ebensogutem Recht zum Magen wie zum Darm gerechnet werden könnte.

Zusammenfassung.

Es existieren bisher keine Beobachtungen über die physikalische und chemische Gesamtarbeitsleistung der Magenverdauung. Das wenige, was wir an Einzelkenntnissen über Magenverdauung besitzen, ist mit Methoden gewonnen, die entweder die physiologischen Vorgänge schwer beeinträchtigen oder sonst grobe Fehlerquellen mit sich bringen.

2. Durch die hier vorgeschlagene Methodik gelingt es, ein Urteil über die Verdauungsarbeit des Magens zu gewinnen unter Verhältnissen, die der physiologischen Norm ziemlich nahe kommen dürften.

3. Für die Verdauung des Fleisches im Magen des Hundes ergeben sich die folgenden wesentlichen Resultate:

Dem Verdauungsprozeß unterliegt niemals die ganze gereichte Nahrung gleichzeitig, sondern die Auflösung vollzieht sich wohl in den oberflächlichen Schichten der Magenwand entlang.

Wenige Minuten nach der Mahlzeit beginnt die Ausstoßung der ersten Verdauungsprodukte.

Dieselben betreten den Darm (bei Verfütterung von rohem Fleisch) in der überwiegenden Menge in dünnflüssiger Form.

Die Entleerung erfolgt schußweise und wird während der ganzen Verdauungszeit durch reflektorischen Pylorusschluß, den der saure Chymus auslöst, in regelmäßiger Weise unterbrochen.

Die Dauer des Pylorusschlusses nimmt mit dem Vorrücken der Verdauungsperiode zu.

Der weitaus größte Teil des zugeführten Fleisches betritt den Darm in gelöster Form (50—65 %), nur circa 20% sind noch ungelöst.

Die überwiegende Menge des gelösten Eiweißes besteht am Ende der Magenverdauung aus Pepton (ca. 80%), der Rest sind Albumosen.

Im Magen findet eine beträchtliche Resorption von Eiweißkörpern statt (ca. 20—30%).

Wird das Zustandekommen des Pylorusreflexes verhindert, so verläuft der Verdauungsprozeß rascher und unvollkommener. Es steigt dann die Menge des ungelösten Eiweißes; die Resorption fällt auf weniger als die Hälfte. In der gelösten Komponente kehrt sich das Mengenverhältnis von Albumosen und Pepton um, sodaß erstere überwiegen.

Verluste von Verdauungssekreten nach außen sowie Wasserverarmung des Organismus überhaupt beeinträchtigen die Magenverdauung in schwerer Weise.

Versuchsprotokolle.

Von den ziemlich zahlreichen angestellten Versuchen teile ich nur eine kleinere Anzahl ausführlich mit und zwar diejenigen, auf die sich unsere Schlußfolgerungen im wesentlichen stützen. Eine ganze Reihe früherer Versuche fielen hierfür schon dadurch außer Betracht, daß im Verlauf der Experimente die Methodik mehrfach geändert und verbessert wurde. Eine große Anzahl von Versuchen mußten wegen sich einstellender technischer Schwierigkeiten oder anderer Unregelmäßigkeiten an verschiedenen Stellen abgebrochen werden. Von den am ersten Versuchshunde angestellten Experimenten teile ich nur die wesentlichen Ergebnisse zweier Parallelversuche mit. Bei diesem Tiere war die sekretorische Tätigkeit des Magens vielleicht, die motorische aber ganz gewiß wesentlich beein-

trächtigt, da derselbe außer der Duodenalfistel auch noch eine Magenfistel trug. Dieselbe bewirkte, daß einmal auch bei längerer Versuchsdauer eine völlige Entleerung des Magens nicht erreicht wurde, und daß sodann bei der sowieso verlängerten Verdauungszeit die einfache Methodik (A) keine von der kombinierten (B) wesentlich verschiedenen Resultate gab.

Die entleerten Mengen von Verdauungsprodukt betrugen nach Verfütterung von 100 g Fleisch bei diesem Hunde I folgende Werte:

Tabelle III.

Versuchs-Nr.	Nahrung	Wasser ¹⁾	Versuchsdauer	Chymusmenge
1	100 g Fleisch	50 ccm	4 $\frac{1}{4}$ Std.	382 g
2	100 „ „	50 „	4 $\frac{3}{4}$ „	446 „
3	100 „ „	—	4 $\frac{1}{2}$ „	423 „
4	100 „ „	50 ccm	4 $\frac{1}{2}$ „	505 „
5	100 „ „	50 „	4 $\frac{1}{2}$ „	465 „

Versuch 1. (18. II. 05.)

Hund I.: Langhaariges, schwarz-weißes Tier. Gewicht ca. 6 kg. Operiert am 10. I. 05: Magenfistel und Duodenalfistel nach Pawlow; glatte Heilung; die Fistel schließt dicht. Bester Gesundheitszustand.

Kombinierte Methodik (B). Von dem im Vorversuch (2 Tage früher) gewonnenen Verdauungsprodukt werden alle 15 Minuten 10—15 ccm durch die Tamponkanüle ins Duodenum eingespritzt. — Vorausgegangen 1 Hungertag. Versuchsnahrung 100 g ausgewaschenes, fein gehacktes, fettfreies, rohes Rindfleisch. Auf jede Injektion sistiert die Entleerung sofort für fast genau 7 Minuten. Versuchsdauer 4 $\frac{1}{2}$ Stunden. 15 Minuten vor dem Ende des Versuchs erhält der Hund 50 ccm Wasser, wird geschüttelt; das Wasser entleert sich sofort wieder in Schüben

¹⁾ Jeweilen vor Abschluß des Versuchs verabreicht.

leicht getrübt. Im Magen findet sich bei Öffnung der Magenfistel ein kleiner Nahrungsrest, der mit Wasser ausgeschwemmt und dessen N-Gehalt bestimmt wird.

Futter: 100 g Fleisch.

Gesamtmenge des Entleerten (inklusive 50 ccm Wasser) 505 g.

N-Gehalt des Fleisches 3,13 g.

Davon erscheinen wieder:

a) in der Duodenalfistel

als ungelöstes Eiweiß 0,564 g N

als gelöstes Eiweiß 1,936 „ „

b) als ausgespülter Magenrestbestand 0,086 „ „

Wiedergefunden im ganzen 2,586 g N

Nicht wieder erschienen (resorbiert) 0,544 „ „

Vom gelösten Eiweiß waren

mit ZnSO_4 aussalzbar (Albumosen) 0,273 g N

nicht aussalzbar (Peptone) 1,663 „ „

Versuch 2. (27. II. 05.)

(Kontrollversuch zu 1.)

Hund I. Alle Details wie im Versuch 1.

Ergebnisse:

Futter: 100 g Fleisch.

Gesamtmenge des Entleerten (inklusive 50 ccm Wasser) 465 g.

N-Gehalt des Fleisches 3,235 g.¹⁾

Davon erscheinen wieder:

a) in der Duodenalfistel

als ungelöstes Eiweiß 0,598 g N

als gelöstes Eiweiß 1,675 „ „

b) als ausgespülter Magenrestbestand 0,161 „ „

Wiedergefunden im ganzen 2,434 g N

Nicht wieder erschienen (resorbiert) 0,801 „ „

Vom gelösten Eiweiß waren

mit ZnSO_4 aussalzbar (Albumosen) 0,602 g N

nicht aussalzbar (Peptone) 1,073 „ „

¹⁾ Die Differenzen im N-Gehalt der einzelnen Fleischportionen rühren im wesentlichen vom verschiedenen Wassergehalt des Fleisches her, da es unmöglich ist, nach dem Waschen immer genau gleich stark auszudrücken.

Versuch 3. (20. III. 05.)

Hund II. grauer, langhaariger Eifelspitz. Gewicht 7 kg.
— Operiert vor ca. 4 Wochen: Duodenalfistel nach Pawlow; glatte Heilung; bester Gesundheitszustand; das Tier lebt gegenwärtig noch, ist gesund.

Einfache Methode (A). Auffangen des durch die offene Fistel entleerten Verdauungsproduktes. — Vorausgegangen 36 stündiges Hungern.

10³⁰ Fütterung mit 100 g gewässertem, fein gehacktem, fettfreiem Rindfleisch; aus der Fistel entleert sich tropfenweise etwas alkalischer Saft und Galle, dann einige Tropfen schwach sauern Saftes.

10⁴⁰ erster kräftiger, sauer reagierender Schuß; hell, fast klar, etwas fadenziehend.

10⁵⁰ etwas häufigere Schüsse ziemlich klarer Flüssigkeit.

10⁵⁰—10⁵⁵ 20 Schüsse, keine Gallenbeimengung.

11⁰⁰ gallertige Klümpchen beigemengt.

11¹⁵ 3—4 Schüsse pro Minute, trüb, oft mit Bröckeln vermischt, wenig, fast keine Galle.

11³⁰ Entleerungen ausgesprochen dicklich, oft größere Klümpchen dabei, dazwischen dünnere, schußweise Entleerungen; etwas Galle.

12⁰⁰ 4—5 Entleerungen von geringer Menge pro Minute.

12¹⁵ Entleerungen seltener, 2 pro Minute.

1¹⁵ nur noch einige Brocken, selten dazwischen kleine flüssige Schübe. 50 ccm Wasser werden mit der Schlundsonde eingegeben, das Tier geschüttelt; sie erschienen sofort wieder, klar.

1³⁰ Abbruch des Versuches; Magenspülung; der Magen erweist sich als leer.

Die entleerte Flüssigkeit ist eine gelbliche, trübe, ziemlich dünnflüssige Masse mit suspendierten Teilchen und reichlichem gröberen und feineren Sediment; dabei größere, makroskopisch erkennbare Fleischpartikel. Reaktion: stark sauer; keine freie HCl.

Ergebnisse:

Futter: 100 g Fleisch.

Gesamtmenge des Entleerten (inklusive 50 ccm Wasser) 392 g.

N-Gehalt des Fleisches 3,27 g.

Davon erscheinen wieder:

als ungelöstes Eiweiß	0,842 g N
als gelöstes Eiweiß	2,115 „ „
Wiedergefunden im ganzen	2,957 g N
Nicht wieder erschienen (resorbiert)	0,313 „ „
Vom gelösten Eiweiß waren	
aussalzbar (Albumosen)	1,266 g N
nicht aussalzbar (Peptone)	0,849 „ „

Versuch 4 (2. IV. 05).

Hund II (wie oben). Vorausgegangen ein Vorversuch (30. III.) nach einfacher Methode (A) zur Gewinnung des ins Duodenum einzuspritzenden Materials. — 24 stündiges Hungern.

Kombinierte Methode B.

6³⁰ Fütterung mit 100 g feingehacktem, fettfreiem Rindfleisch (roh), das 3 Stunden lang in Wasser gewaschen wurde. Aus der Fistel tropf etwas alkalisches Sekret.

6³⁷ Einsetzen schußweiser saurer Entleerungen, darauf Einführung und Aufblasen des Tamponkatheters; die Entleerungen sistieren kurze Zeit.

6⁴³ wieder regelmäßige, sauer reagierende Schüsse.

6⁴⁷ (Injektion Nr. 1) die Entleerung sistiert sofort, es fließt etwas wasserheller, alkalischer Saft (Pankreassaft) ab, dann reichlich Galle. Nach Verlauf von 7 Minuten stellen sich regelmäßige, schußweise Entleerungen ein.

6⁵⁷ (Injektion Nr. 2) Entleerungen sistieren 3 Minuten, setzen dann wieder ein; Zahl 5 pro Minute, dünnflüssig, wenig trüb.

7⁰⁷ (Injektion Nr. 3) sofortiges Sistieren, dann Entleerung von Bauchspeichel und Galle (wie oben), nach 8 Minuten saure Schüsse.

7¹⁰—7¹⁷ 20 Schüsse, erst langsam, abwechselnd mit etwas Galle, von 7¹² an regelmäßig.

7¹⁸ (Injektion Nr. 4) Sistieren sofort; dann Verlauf wie bei Injektion Nr. 1, Pause 3 Minuten.

7⁵⁵ regelmäßige, an Volumen zunehmende Schüsse usw.

7⁵⁰ nach der Pause ist dem ersten Schuß etwas dickliches Material beigemischt; dasselbe läßt sich von jetzt an immer beobachten.

8⁰⁰ Entleerungen etwas seltener und etwas dicker.

8³⁴—8⁴³ 14 Schüsse; die Pausen nach der Injektion sind allmählich auf 10 Minuten gestiegen.

9⁰⁷ (Injektion Nr. 13) nachher während 15 Minuten keine Entleerung, dann einige dicke Schübe; von jetzt an entleert sich fast nichts mehr.

9⁴⁵ 50 ccm Wasser mit der Schlundsonde eingeführt, erschienen sofort fast klar wieder.

Abbruch des Versuches, Magenspülung.

Die entleerte Masse ist dünnflüssig, erbsuppengelb, sedimentiert. Das Sediment ist in den oberen Schichten feinflockig, unten werden die Teilchen gröber; unveränderte Fleischklümpchen sind nicht erkennbar. Reaktion sauer; keine freie HCl.

Ergebnisse:

Futter: 100 g Fleisch.

Gesamtmenge des Entleerten (inklusive 50 ccm Wasser) 394 g.

N-Gehalt des Fleisches 2,90 g N.

Davon erscheinen wieder:

a) in der Duodenalfistel

als ungelöstes Eiweiß 0,770 g N

als gelöstes Eiweiß 1,424 » »

b) im Magenspülwasser 0,064 » »

Wiedergefunden zusammen 2,258 g N

Nicht wieder erschienen (resorbiert) 0,642 » »

Vom gelösten Eiweiß waren

mit ZnSO₄ aussalzbar (Albumosen) 0,323 g N

nicht aussalzbar (Peptone) 1,101 » »

Versuch 5 (9. IV.).

(Kontrollversuch zu 4 unter genau gleichen Bedingungen.)

Hund II (wie oben). Vorversuch am 6. IV. 1 Hungertag.

Äußerer Verlauf bis in die meisten Einzelheiten gleich wie bei 4. Erste Schüsse nach 12 Minuten. Nach Einführung des Ballons 5minütiges Sistieren; später die Pausen nach den Injektionen steigend.

Ergebnisse:

Futter: 100 g Fleisch.

Gesamtmenge des Entleerten (inklusive 50 ccm Wasser) 336 g.

N-Gehalt des Fleisches 2,90 g.

Davon erscheinen wieder:

a) in der Duodenalfistel

als ungelöstes Eiweiß 0,597 g N

als gelöstes Eiweiß 1,401 » »

b) im Magenspülwasser 0,029 » »

Wiedergefunden im ganzen 2,027 g N

Nicht wieder erschienen (resorbiert) 0,873 » »

Vom gelösten Eiweiß waren

durch ZnSO_4 aussalzbar (Albumosen) 0,243 g N

nicht aussalzbar (Peptone) 1,158 » »



Über Peptone.

Von

Walter Neumann.

Mit 26 Kurvenzeichnungen.

(Der Redaktion zugegangen am 22. Mai 1905.)

Der näheren Untersuchung der Peptone¹⁾ hatte sich bisher der Umstand hinderlich entgegengestellt, daß sie nicht in reinem Zustande gewonnen werden konnten. Nachdem Herr Prof. Siegfried in neuerer Zeit eine Methode zu ihrer Reindarstellung ausgearbeitet hatte, schien auch der Augenblick zur Inangriffnahme einer eingehenderen Untersuchung gekommen, und es ist daher auf Herrn Prof. Siegfrieds Anregung hin diese Arbeit unternommen worden, um die von ihm und seinen Schülern durch Anwendung rein chemischer Methoden bereits erlangten Aufschlüsse durch die Mittel der physikalischen Chemie zu erweitern. Herr Prof. Siegfried war so liebenswürdig, das von ihm, resp. nach seinen Angaben gewonnene Material in freigiebigster Weise zur Verfügung zu stellen. Da indessen seine eigenen Peptonvorräte infolge der langwierigen und wenig ergiebigen Darstellungsmethode sehr beschränkt sind, so mußte mit der Substanz im höchsten Maße sparsam umgegangen werden,

¹⁾ Vergl. Paul Mühle, Versuche zur Reindarstellung des Amphopeptons, Inauguraldissertation, Leipzig 1901.

M. Siegfried, Diese Zeitschrift, Bd. XXXV, S. 164 (1902), Über Antipeptone.

Ebendaselbst, S. 263, Fritz Müller, Beiträge zur Kenntnis der Antipeptone.

S. 289, Curt Borkel, Über Pepsinfibrinpepton.

S. 320, Th. Krüger, Zur Kenntnis der tryptischen Verdauung des Leims.

Friedrich Wilhelm Scheermesser, Zur Kenntnis der peptischen Verdauung des Leims, Inauguraldissertation, Leipzig 1903.

unter Ausschluß aller Versuche, welche nur irgendwie nennenswertere Substanzmengen erforderten.

Bisher hat Herr Prof. Siegfried sechs Peptone dargestellt, welche sich durchwegs als ausgesprochene Säuren erwiesen. Die Äquivalentgewichte derselben hatte er aus den Baryum- und Zinksalzen zu bestimmen versucht, und obgleich die auf diese Weise ermittelten Zahlen in guter Übereinstimmung mit den an wässerigen Peptonlösungen durch die Gefrierpunktmethode erhaltenen Molekulargewichten standen, so hat Herr Prof. Siegfried doch nicht ermangelt, darauf hinzuweisen, daß die Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmung mit großer Vorsicht beurteilt werden müßten und daß die richtigen Molekulargewichte voraussichtlich größer sein würden, als nach den Gefrierpunktmessungen zu schließen war. Da auf die Baryum- und Zinksalze ebenso wie auf die Molekulargewichte der Peptone an späterer Stelle noch zurückgekommen werden soll, so sei hier nur erwähnt, daß die Zusammensetzung der Peptone bei den verschiedensten Darstellungen und trotz häufiger Umfällungen eine recht befriedigende Konstanz aufgewiesen hat, was im Verein mit den Ergebnissen dieser Arbeit einen Zweifel an der chemischen Individualität der Peptone ausschließen dürfte.

Die folgende Tabelle gibt eine Zusammenstellung der erwähnten sechs Peptone

	Formel	Formelgewicht
1. Trypsinfibrinpepton α oder Anti-pepton α	$C_{10}H_{17}N_2O_6$	259
2. Trypsinfibrinpepton β oder Anti-pepton β	$C_{11}H_{19}N_2O_6$	273
3. Pepsinfibrinpepton α	$C_{21}H_{34}N_6O_9$	515
4. Pepsinfibrinpepton β	$C_{21}H_{36}N_6O_{10}$	533
5. Pepsinglutinpepton	$C_{23}H_{39}N_7O_{10}$	573
6. Trypsinglutinpepton β	$C_{19}H_{30}N_6O_9$	486

Die zu beschreibenden Versuche haben sich auf die Peptone Nr. 1, 2, 3 und 5 erstreckt. Am eingehendsten konnte das Pepsinfibrinpepton α untersucht werden, da dieses am reichlichsten zur Verfügung stand.

Beschreibung. Die untersuchten Peptone sind weiße oder gelbliche Pulver von äußerst geringem spezifischen Gewicht. In Wasser sind sie leicht, in den gewöhnlichen organischen Lösungsmitteln dagegen schwer löslich, ausgenommen in geschmolzenem Phenol. Sie sind optisch aktiv und zwar sämtlich linksdrehend. Auf Lackmuspapier wirken sie intensiv rötend. Daß sie auch als Basen fungieren können, also amphoteren Charakter besitzen, soll noch bewiesen werden. Sie sind äußerst hygroskopisch. Um sie zu trocknen, wurden sie in 3—4 mm hoher Schicht in Wägegläschen über Phosphorpentoxyd auf 60°, im späteren Stadium der Arbeit auf 69° erhitzt. Der Trockenprozeß wurde so lange fortgesetzt, bis im Laufe mehrerer Tage nur eine Abnahme von ca. 1‰ zu beobachten war. Völlige Gewichtskonstanz konnte nie erreicht werden: In der Regel nahm das Trocknen 3—4 Wochen in Anspruch, häufig aber auch länger.

Elektrische Leitfähigkeit.¹⁾ Die Leitfähigkeitsbestimmungen an wässrigen Peptonlösungen ergaben folgende Werte der molekularen Leitfähigkeit (unter Annahme der auf Seite 3 angegebenen Molekulargewichte).

Pepsinfibrinpepton α

Technisches Präparat ²⁾		Präparat Borkel ²⁾		Differenz
μ_{16}	14,84	$\mu_{15,84}$	10,81	4,03
μ_{32}	15,55	$\mu_{31,68}$	11,30	4,25
μ_{64}	18,08	$\mu_{63,36}$	12,97	5,11
μ_{128}	19,86	$\mu_{126,7}$	14,57	5,29
μ_{256}	21,76	$\mu_{253,4}$	16,87	4,89
μ_{512}	(26,52)			
μ_{1024}	(31,36)			

¹⁾ Alle Angaben über elektrische Leitfähigkeit sind in reziproken Ohms ausgedrückt.

²⁾ Das «Präparat Borkel» ist von Herrn Dr. Borkel (in der chem. Abteilung des physiologischen Instituts in Leipzig) hergestellt und mir mit seiner freundlichen Erlaubnis zur Verfügung gestellt worden. Das technische Präparat stammt aus der chemischen Fabrik von Heyden in Radebeul und ist nach Herrn Prof. Siegfrieds Vorschrift dargestellt.

Antipepton α	Antipepton β
μ_8 15,88	12,46
μ_{16} 18,01	14,14
μ_{32} 20,44	15,81
μ_{64} 23,70	17,66
μ_{128} 28,82	20,24
μ_{256} 36,99	(24,25)
μ_{512} (49,23)	(30,58)
μ_{1024} (66,51)	

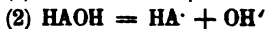
Die Leitfähigkeit des Wassers kommt bei den höheren Konzentrationen nicht in Betracht. Diejenigen Werte, bei welchen sie 1% der gemessenen Leitfähigkeit übersteigt, sind eingeklammert.

Wie ersichtlich, besitzt von den beiden Pepsinfibrinpeptonen das technische eine höhere Leitfähigkeit, und zwar unterscheiden sich die Werte für gleiche Verdünnungen um eine nahezu konstante Größe, was auf Verunreinigung des technischen Präparates durch eine Spur eines Neutralsalzes hindeutet. Die übrigen drei Präparate sind mir, ebenso wie das Präparat Borkel als völlig aschefrei bezeichnet worden. Ob die gefundene Leitfähigkeit tatsächlich nur den Peptonen zukommt, oder ob sie nicht doch zum Teil auf Rechnung geringer Verunreinigungen salzartiger Natur zu setzen ist, hat sich nicht mit Sicherheit entscheiden lassen.¹⁾ Eine Dissoziationskonstante läßt sich jedenfalls (unter der Annahme, daß bei höheren Konzentrationen nur ein Wasserstoffion abgespalten wird) für keines der untersuchten Peptone berechnen, auch dann nicht, wenn man, um den Einfluß der vermuteten Verunreinigungen zu eliminieren, versuchsweise verschiedene Abzüge von den gefundenen Leitfähigkeitswerten macht. Die neuerdings erschienenen Abhandlungen von Walker²⁾ über die Theorie der amphoteren Elektrolyte haben auch gezeigt, daß das Ostwaldsche Verdünnungsgesetz auf letztere nicht ohne weiteres anwendbar ist.

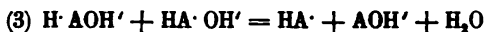
¹⁾ Aus später zu erwähnenden Versuchen geht indessen hervor, daß der Betrag salzartiger Verunreinigungen nur klein sein kann.

²⁾ Zeitschrift f. physik. Chemie, Bd. XLIX, S. 82 (1904) und Bd. LI, S. 706 (1905).

Nach Walker findet bei einem amphoteren Stoff von der Zusammensetzung HAOH , welcher der Dissoziation nach den beiden folgenden Richtungen fähig ist



zum Teil die Reaktion

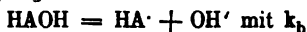


statt, und aus den Walkerschen Rechnungen ergibt sich, daß die Konzentration der durch letzteren Vorgang entstehenden Ionen unter Umständen tausendmal so groß sein kann, als die Konzentration der Ionen, welche der einfachen Säuredissoziation (Vorgang 1) ihre Entstehung verdanken. Die Leitfähigkeit der Peptonlösungen gibt uns daher kein Maß für die Säurestärke. Leider lassen sich die Walkerschen Formeln nicht auf den vorliegenden Fall anwenden, da sie nur für einwertige amphotere Elektrolyte gelten, wir es aber, wie noch gezeigt werden soll, mit mehrwertigen zu tun haben, bei welchen die Gleichgewichtsverhältnisse noch viel verwickelter und unzugänglicher liegen.

Aus den Walkerschen Formeln läßt sich ein nicht uninteressanter Schluß hinsichtlich des Verhaltens amphoterer Stoffe bei unendlicher Verdünnung ziehen. Bezeichnet man die Dissoziationskonstante des Vorganges



diejenige des Vorganges



so gilt nach Walker, wenn K das Ionenprodukt des Wassers und u die Konzentration des nichtdissoziierten amphoteren Stoffes bedeutet

$$(\text{HA} \cdot) = \frac{k_b}{K} u (\text{H}')$$

$$(\text{AOH}') = \frac{k_a}{K} u (\text{OH}')$$

$$(\text{H}') = \sqrt{\frac{K + k_a u}{1 + \frac{k_b}{K} u}}$$

Für die OH -Ionenkonzentration läßt sich der analoge Ausdruck

$$(\text{OH}') = \sqrt{\frac{K + k_b u}{1 + \frac{k_a}{K} u}}$$

berechnen.

Bei unendlich großer Verdünnung wird $u=0$, und infolgedessen

$$(\text{HA}') = (\text{AOH}') = 0$$

$$\text{und } (\text{H}') = (\text{OH}') = \sqrt{K}$$

Die Ionen HA' und AOH' verschwinden also, während die H' - und OH' -Ionen vollständig abgespalten werden. Einwertige amphotere Stoffe würden daher bei großen Verdünnungen einem Endwert der molekularen Leitfähigkeit zustreben, welcher sich aus den Wanderungsgeschwindigkeiten des H - und OH -Ions zusammensetzt und daher weit größer ist, als bei Säuren und Basen, oder gar bei Salzen.

Wasserstoffionkonzentration. Da, wie gesagt, die Leitfähigkeit kein Maß für die Wasserstoffionkonzentration lieferte und da sich die Methoden der Esterverseifung und der Rohrzuckerinversion als ungeeignet erwiesen hatten — die erstere wegen des Versagens der Indikatoren in Gegenwart der Peptone, die zweite wegen der zu geringen Geschwindigkeit —, so wurde versucht, die Wasserstoffionkonzentration wenigstens für das Pepsinfibrinpepton durch Messung der elektromotorischen Kraft der Wasserstoffkette¹⁾ zu ermitteln. Die Versuchsanordnung war dieselbe, wie bei Löwenherz,²⁾ mit den geringfügigen Abänderungen, wie sie die Verwendung eines Flüssigkeits- an Stelle eines Luftthermostaten erheischte. Als Elektroden dienten paladinierte Goldbleche.³⁾ Das eine Elektrodengefäß wurde mit $\frac{1}{16}$ -molekularnormaler Peptonlösung, das andere mit $\frac{1}{5}$ -normaler Natronlauge beschickt. Als Zwischenelektrolyt diente bei einem Teil der Versuche gesättigte NaCl -Lösung (zur Vermeidung von Diffusionspotentialen), bei dem anderen Teil $\frac{1}{5}$ -normale NaCl -Lösung. In letzterem

¹⁾ Le Blanc, Elektrochemie, 3. Aufl., S. 175.

²⁾ Zeitschrift f. physik. Chemie, Bd. XX, S. 283.

³⁾ Böttger, Zeitschr. f. physik. Chemie, Bd. XXIV, S. 260 (1897).

Falle wurde das Diffusionspotential an der Stelle Pepton-NaCl vernachlässigt, dasjenige an der Grenzfläche NaCl-NaOH nach der Formel

$$\pi = \frac{RT}{F} \ln \frac{l'_K + l'_A}{l''_K + l'_A}$$

berechnet,¹⁾ wo l'_K und l'_A die Wanderungsgeschwindigkeiten der Ionen des NaCl, l''_K und l''_A die gleichen Größen für Natronlauge bedeuten. Für 25° und bei Verwendung der Wanderungsgeschwindigkeiten, wie sie in Ostwald-Luther, Physiko-chemische Messungen angegeben sind, berechnet sich hiernach eine Korrektur von + 0,0172 Volt.

Die Versuche ergaben:

1. 0,554 Volt	} Zwischenelektrolyt gesättigte NaCl-Lösung
2. 0,554 „	
3. 0,558 „	
4. 0,557 „	} Zwischenelektrolyt 1/5-Norm.-NaCl-Lösung
5. 0,553 „	
6. 0,562 „	

Mittel 0,557 Volt.

In den Versuchen 5 und 6 enthielt die Peptonlösung noch 1/100-Normal-NaCl-Lösung zur Erhöhung der Leitfähigkeit. Unter der Annahme, daß 1/5-Normal-NaOH-Lösung zu 84% dissoziiert ist (diese Zahl ist aus Leitfähigkeitsbestimmungen berechnet), ergibt sich die Wasserstoffionkonzentration zu 0,00019 Mol. pro Liter. Eine 1/16-molekularnormale Pepsin-Fibrinpeptonlösung ist demnach ungefähr 0,0002-normal in bezug auf Wasserstoffion. Zum Vergleiche sei erwähnt, daß eine ebenso konzentrierte Essigsäurelösung eine Wasserstoffionkonzentration von 0,00105 Mol. pro Liter besitzt. Die elektrische Leitfähigkeit, welche der eben berechneten Säuredissoziation des Peptons zukommt, ist natürlich bedeutend geringer, als sie bei den 1/16-molekularnormalen Lösungen (Präparat Borkel) gefunden wurden. Doch wäre dies, wie oben bereits erwähnt, kein Beweis für das Vorhandensein von

¹⁾ Le Blanc, Elektrochemie, 3. Aufl., S. 188.

²⁾ Zeitschrift f. physik. Chemie, Bd. III, S. 174 (1889).

Verunreinigungen. Im Gegenteil ist ein solches Verhalten nach den Walkerschen Auseinandersetzungen sogar zu erwarten.

Verhalten gegen kolloidale Goldlösung. Mit der relativ hohen Leitfähigkeit der Peptonlösungen steht ihr Verhalten gegen kolloidale Goldlösung in Übereinstimmung. Schulz und Zsigmondy¹⁾ hatten gefunden, daß gewisse Kolloide die Fällbarkeit von kolloidaler Goldlösung durch Elektrolyte verhinderten, und zwar bedurfte es zur Verhinderung der Fällung unter sonst gleichen Verhältnissen verschiedener Mengen der verschiedenen Kolloide. Die beiden Forscher haben auf dieses Verhalten eine Methode zur Unterscheidung verschiedener Eiweißarten gegründet. Bei dem Versuche, die Goldzahl auch für die Peptone zu bestimmen, stellte sich heraus, daß diese die Fällung der Goldlösung nicht nur nicht verhindern, sondern selbst hervorbringen.

Bindungsvermögen der Peptone für Basen und Säuren — Äquivalentgewichte. Zur Feststellung des Bindungsvermögens der Peptone für Basen und Säuren gelangte eine Methode zur Verwendung, deren sich Sjöqvist²⁾ zum ersten Male zu Äquivalentgewichtsbestimmungen bedient haben dürfte.³⁾ Die anderen hauptsächlich in Frage kommenden Methoden, Messung der elektromotorischen Kräfte⁴⁾ und der Inversionsgeschwindigkeit von Rohrzucker⁵⁾ sind im vorliegenden Falle weniger gut verwendbar. Die verwendete Methode kommt

¹⁾ Zeitschrift f. d. ges. Biochemie, Bd. III.

Zeitschrift f. anal. Chemie, Bd. XL, S. 697 (1901).

²⁾ Skand. Archiv für Physiologie, Bd. V, S. 277 (1895); Bd. VI, S. 255 (1896).

³⁾ Ähnliche Leitfähigkeitsversuche, wie die hier zu beschreibenden, sind schon viel früher als die Sjöqvistschen angestellt worden.

Vergl. z. B. Kohlrausch, Wied. Ann., Bd. XXVI, S. 225 (1885).

Zeitschr. f. physik. Chem., Bd. XII, S. 780 (1893).

Daniel Berthelot, Ann. chim. phys., Bd. XXIV, S. 5 (1891).

Whitney, Zeitschr. f. physik. Chem., Bd. XX, S. 45 (1895).

Indessen scheint Sjöqvist das in dieser Arbeit benützte graphische Extrapolationsverfahren zum erstenmal angewendet zu haben.

⁴⁾ Bugarszky und Liebermann, Pflügers Archiv, Bd. LXXII, S. 51 (1898).

⁵⁾ Cohnheim, Zeitschr. f. Biologie, Bd. XXXIII, S. 489 (1896).

im wesentlichen auf ein Titrationsverfahren unter Verwendung der elektrischen Leitfähigkeit als Indikator heraus und gründet sich auf die im Vergleich zu den anderen Ionen bedeutend höhere Wanderungsgeschwindigkeit der Wasserstoff- und Hydroxylionen. Das Prinzip sei an folgendem Beispiel erläutert.

Wir denken uns eine Lösung, welche durch Vermischen gleicher Volumina von $16/100$ -Normal-NaOH-Lösung und $2/100$ -Normal-HCl-Lösung entstanden ist, fortgesetzt mit $1/100$ -Normal-HCl-Lösung verdünnt, sodaß jedesmal das Volumen auf das Doppelte steigt. Dann werden die ersten vier Lösungen alle $1/100$ -normal in bezug auf NaCl sein, während der Gehalt an freier Natronlauge von $7/100$ Mol. pro Liter in Lösung 1 auf 0 in Lösung 4 fällt. Infolgedessen wird eine stetige und rasche Abnahme des elektrischen Leitvermögens stattfinden. Wird die Verdünnung weiter getrieben, so besteht die durch sie bewirkte Veränderung von jetzt ab darin, daß an Stelle des langsam wandernden Natriumions das schnell wandernde H-Ion tritt. Daher wird die Leitfähigkeit von Lösung 4 an wieder eine starke Zunahme zeigen. Die neutrale Lösung 4, in welcher Natronlauge und Salzsäure in äquivalenten Mengen vorhanden sind, zeichnet sich demnach durch die niedrigste Leitfähigkeit aus. Stellt man die Verhältnisse graphisch dar, indem man den Na-Gehalt als Abszissen, die Leitfähigkeit als Ordinaten aufträgt, so muß sich, da anfänglich die Leitfähigkeit proportional dem Na-Gehalt abnimmt, vom Neutralisationspunkt an hingegen proportional dem Na-Gehalt zunimmt, eine Kurve mit 2 geradlinigen Ästen ergeben, deren Schnittpunkt dem neutralen Gemisch entspricht (Fig. 1). Die Abszisse dieses Schnittpunktes würde das Äquivalentgewicht von Natronlauge zu berechnen gestatten.

Der eben betrachtete Fall betraf die Neutralisation einer starken Säure mit einer starken Base. Ist hingegen der eine der beiden Elektrolyte schwach dissoziiert, wie dies ja auch bei den untersuchten Peptongemischen zutrifft, so ist der Verlauf der Neutralisationskurve in zwei Hinsichten von dem beschriebenen verschieden. Betrachten wir etwa den Verlauf für Salzsäure-Anilingemische. Während bei den HCl-NaOH-Gemischen der Überschuß der NaOH die Leitfähigkeit stark

erhöhte, und daher der Kurvenast, welcher die alkalischen Gemische repräsentierte, stark geneigt war, wird ein Überschuß von Anilin über die von der Salzsäure gebundene Menge praktisch keinen Einfluß auf die Leitfähigkeit haben. Infolgedessen wird der Kurvenast, welcher die Gemische mit Anilinüberschuß darstellt, nahezu horizontal verlaufen. Die zweite Abweichung betrifft den Kurventeil in der Gegend des neutralen Gebietes und wird durch die Hydrolyse bewirkt. Da letztere die Leitfähigkeit eines Salzes erhöht, so wird die Kurve des hydrolysierten Salzes immer oberhalb derjenigen des nicht-hydrolysierten liegen müssen. Es ist klar, daß die Hydrolyse um so größer sein wird, je mehr sich das Verhältnis von Säure und Base demjenigen ihrer Äquivalentgewichte nähern wird, d. h. je näher wir dem Neutralisationspunkte kommen. Hingegen wird der Einfluß der Hydrolyse ein um so geringerer sein, je größer der Überschuß von Säure oder Base ist, je weiter wir also auf den Kurvenästen vom Neutralisationspunkt weg gelangen, und bei genügend großem Überschuß des einen Bestandteiles wird man die Hydrolyse als praktisch völlig zurückgedrängt betrachten dürfen. Fig. 2 stellt eine Kurve dar, berechnet für die Neutralisation einer schwachen Säure (Dissoziationskonstante $= 1 \cdot 2 \times 10^{-10}$) mit $1/100$ -Normal-NaOH, unter der Annahme, daß die Natronlauge und das gebildete Natriumsalz vollständig dissoziiert sind, während die Leitfähigkeit der freien Säure zu vernachlässigen ist. Aus der Figur ist ersichtlich, daß zwar die äußeren Teile (wo die Hydrolyse genügend weit zurückgedrängt ist) der beiden Kurvenäste wie in Fig. 1 geradlinig verlaufen, daß aber an Stelle des scharfen Knickpunktes, auf welchen es uns hauptsächlich ankommt, ein allmählicher Übergang der beiden Kurvenäste ineinander getreten ist. Um nun die Lage des Knickpunktes für den Fall, daß er nicht durch Hydrolyse verwischt worden wäre, festzustellen, brauchen wir nur nach dem Vorgange Sjöqvists die geradlinigen Teile der beiden Kurvenäste bis zu ihrem Durchschnittspunkte nach innen zu verlängern. Es ergibt sich auf diese Weise die Kurve des nicht hydrolysierten Salzes, deren Knickpunkt die gewünschten Daten liefert. Die Methode gibt — Vor-

aussetzung ist natürlich ein sehr genaues Koordinatenpapier — selbst bei sehr schwachen Säuren und Basen, speziell bei Verwendung nicht zu verdünnter Lösungen, recht befriedigende Werte. Zum Beweise sei hier eine Messung an Kreatin und Salzsäure angeführt. Das Kreatin ist eine so schwache Base, daß es gegen Lackmuspapier vollständig neutral reagiert.

Vor der Angabe der Zahlen sei kurz die Ausführung des Versuches beschrieben. In ein 11-ccm-Kölbchen wurden 2 ccm einer Salzsäure von solcher Konzentration gebracht, daß nach dem Auffüllen des Kölbchens bis zur Marke eine $\frac{1}{64}$ -normale Salzsäure resultiert haben würde. Vor dem Einpipettieren der Salzsäure war eine bestimmte Menge Kreatin (das Mehrfache von der der Salzsäure äquivalenten Menge) in das Kölbchen gebracht worden. Nach dem Auffüllen des Kölbchens gelangte man daher zu einer Lösung, welche ein Gemisch von $\frac{1}{64}$ -Normal-HCl mit einem großen Überschuß von Kreatin darstellte. Diese Lösung wurde nach Feststellung ihrer Leitfähigkeit im Leitfähigkeitsgefäße in der üblichen Weise¹⁾ mit $\frac{1}{64}$ -Normal-Salzsäure verdünnt und die Leitfähigkeit jedesmal gemessen. Alle Lösungen hatten demnach die gleiche Konzentration an Salzsäure, während die Konzentration des Kreatins mit jeder Verdünnung abnahm und zuletzt auf sehr niedrige Werte sank. Sämtliche noch anzugebenden Leitfähigkeitsversuche sind in dieser Weise, also unter Konstanthaltung der HCl- (resp. NaOH-) Konzentration ausgeführt worden, oder richtiger gesagt, unter Konstanthaltung der Gesamthlorkonzentration im einen, der Gesamtnatriumkonzentration im anderen Falle.

Die Messungen an Kreatin ergaben die in der ersten Tabelle auf Seite 227 angeführten Werte.

Die erste Kolonne gibt die Konzentration des Kreatins in Gramm pro Liter an, die zweite in Bruchteilen der Konzentration der ersten (konzentriertesten) Lösung. Aus der Abszisse des Schnittpunktes der beiden Kurvenasymptoten berechnet sich ein Äquivalentgewicht von 172, welches das theoretische trotz der großen Hydrolyse nur um 8% über-

¹⁾ Ostwald-Luther, Physiko-chem. Messungen, S. 413.

steigt. Die Tatsache, daß bei sehr großer Hydrolyse die nach dieser Methode ermittelten Äquivalentgewichte etwas zu groß ausfallen müssen, soll später noch eingehender besprochen werden.

Kreatin mit $\frac{1}{64}$ -Norm.-HCl (Fig. 3).

g Kreatin im l	B.	Spez. Leitfähigkeit	Äquivalentgewicht gef.	Formelgewicht
9,991	1	$0,1710 \times 10^{-2}$	172	159,2
4,9955	$\frac{1}{2}$	0,2019		
2,4978	$\frac{1}{4}$	0,2896		
1,2489	$\frac{1}{8}$	0,4260		
0,6245	$\frac{1}{16}$	0,5238		
0,3123	$\frac{1}{32}$	0,5783		
0,1562	$\frac{1}{64}$	0,6062		
0	0	0,6335		

Die Anwendbarkeit der Methode auch auf zweibasische Säuren möge durch folgende Messungen an Tellursäure dargestellt werden.

$\text{H}_2\text{TeO}_4 (+ 2\text{H}_2\text{O})$ mit $\frac{1}{20}$ -Norm.-NaOH (Fig. 4).

g H_2TeO_6 im l	B.	Spez. Leitfähigkeit	Äquivalentgewicht gef.	$\frac{1}{2}$ -Formelgewicht
46,01	1	$0,3098 \times 10^{-2}$	119	115
30,67	$\frac{2}{3}$	0,3180		
23,01	$\frac{1}{2}$	0,3229		
15,34	$\frac{1}{3}$	0,3281		
11,50	$\frac{1}{4}$	0,3326		
7,668	$\frac{1}{6}$	0,3744		
5,752	$\frac{1}{8}$	0,4557		
2,876	$\frac{1}{16}$	0,7515		
1,438	$\frac{1}{32}$	0,9340		
0,719	$\frac{1}{64}$	1,030		
0,3595	$\frac{1}{128}$	1,076		
0,1798	$\frac{1}{256}$	1,097		
0	0	1,128		

Wiederholung des Versuchs ergab ein Äquivalentgewicht von 120, ein ähnlicher Versuch mit $1/64$ -Normal-NaOH ein solches von 117. Um das aus einem Vergleich der beiden Figuren (4 und 5) deutlich ersichtliche Fortschreiten der Hydrolyse mit der Verdünnung der angewandten Lösungen zu zeigen, möge auch letzterer Versuch hier angeführt werden.

Tellursäure mit $1,049/64$ -Norm.-NaOH (Fig. 5).

g H_2TeO_6 im l	B.	Spez. Leitfähigkeit	Gef. Äquivalentgewicht	$1/2$ -Formelgewicht
15,05	1	$0,1161 \times 10^{-2}$		
10,08	$2/3$	0,1173		
7,525	$1/2$	0,1180		
5,017	$1/3$	0,1187		
3,7625	$1/4$	0,1199		
2,5084	$1/6$	0,1502		
1,8813	$1/8$	0,1834	117	116
0,9407	$1/16$	0,2679		
0,4704	$1/32$	0,3222		
0,2352	$1/64$	0,3489		
0,1176	$1/128$	0,3640		
0,0588	$1/256$	0,3709		
0	0	0,3829		

Die gefundenen Äquivalentgewichte stimmen also auch bei der Tellursäure in recht befriedigender Weise mit dem theoretischen (in diesem Falle dem halben Formelgewicht) überein. Wie aus den Figuren ersichtlich, gehen die Tellursäurekurven (von links nach rechts durchlaufen) ungefähr bei dem Punkte $1\text{H}_2\text{TeO}_4 : 1\text{NaOH}$ in den horizontalen Ast über. Aus diesem Umstande schlossen Miolati und Mascetti,¹⁾ welche Autoren ähnliche Versuche mit Tellursäure, aber in unzureichend verdünnten Lösungen anstellten, daß in Lösung die Tellursäure nur ein Molekül Natronlauge zu binden vermöge, weshalb sie dem Natriumtellurat die Formel $\text{Na}_2\text{Te}_2\text{O}_7$ zuzu-

¹⁾ Gazz. chim. Ital., Bd. XXXI [1] (1901).

schreiben geneigt sind. Im Gegensatz zu dieser Ansicht ergibt, wie oben gezeigt, die graphische Extrapolation, daß die Tellursäure in Lösung sehr wohl auch das neutrale Salz Na_2TeO_4 bildet.

Bevor wir zu den Versuchen an Peptonlösungen übergehen, sollen hier noch einige Messungen an den bekannten Stoffen Glykokoll und Asparagin angegeben werden. Diese Versuche waren unternommen worden, einerseits um die Methode an Stoffen zu erproben, welche den Peptonen vermöge ihres amphoteren Charakters ähnlich sind, hauptsächlich aber, um den Einfluß der Konzentration der verwendeten Lösungen auf das Ergebnis der Methode kennen zu lernen. Untersucht wurden Gemische von Glykokoll resp. Asparagin mit Natronlauge und mit Salzsäure, und zwar gelangten letztere beiden in den Konzentrationen $1/30$, $1/40$ und $1/64$ Molekül pro Liter zur Verwendung. Um die Zahlen und Figuren nicht zu sehr zu häufen, seien hier nur die Versuche mit $1/30$ - und $1/64$ -normalen Lösungen angeführt.

Glykokoll (Formelgewicht = 75,08)

mit $\frac{1}{30}$ -Norm.-NaOH (Fig. 6).				mit $\frac{1}{30}$ -Norm.-HCl (Fig. 7).				
g Glykokoll pro Liter	B.	Spez. Leit- fähigkeit	Gefund. Äqui- valent- gewicht	g Glykokoll pro Liter	B.	Spez. Leit- fähigkeit	Gefund. Äqui- valent- gewicht	
15,08	1	$0,3639 \times 10^{-2}$	73,3	15,11	1	$0,5325 \times 10^{-2}$	79,45	
12,52	$\frac{5}{6}$	0,3649		10,073	$\frac{2}{3}$	0,5649		
10,74	$\frac{5}{7}$	0,3653		7,555	$\frac{1}{2}$	0,6058		
9,396	$\frac{5}{8}$	0,3663		5,037	$\frac{1}{3}$	0,7197		
8,352	$\frac{5}{9}$	0,3669		3,778	$\frac{1}{4}$	0,8684		
7,515	$\frac{1}{2}$	0,3677		2,518	$\frac{1}{6}$	1,142		
3,7575	$\frac{1}{4}$	0,3880		1,889	$\frac{1}{8}$	1,325		
1,8788	$\frac{1}{8}$	0,7349		0,9444	$\frac{1}{16}$	1,638		
0,9394	$\frac{1}{16}$	0,9292		0,4772	$\frac{1}{32}$	1,805		
0,4697	$\frac{1}{32}$	1,024		0,2361	$\frac{1}{64}$	1,891		
0,2349	$\frac{1}{64}$	1,073		0,1181	$\frac{1}{128}$	1,935		
0,1175	$\frac{1}{128}$	1,095		0,0590	$\frac{1}{256}$	1,955		
0,0588	$\frac{1}{256}$	1,109		0	0	1,971		
0	0	1,127						
Wiederholung des Versuches ergab ein Äquivalentgew. von 72,0				Wiederholung des Versuches ergab ein Äquivalentgew. von 82,7				

mit $\frac{1}{64}$ -Norm.-NaOH (Fig. 8).

g Glykokoll pro Liter	B.	Spez. Leit- fähigkeit	Gefund. Äqui- valent- gewicht
9,386	1	$0,1225 \times 10^{-2}$	70,44
6,257	$\frac{2}{3}$	0,1228	
4,693	$\frac{1}{3}$	0,1231	
3,129	$\frac{1}{6}$	0,1233	
2,347	$\frac{1}{4}$	0,1240	
1,178	$\frac{1}{6}$	0,1340	
0,5867	$\frac{1}{16}$	0,2358	
0,2934	$\frac{1}{32}$	0,2976	
0,1467	$\frac{1}{64}$	0,3286	
0,0734	$\frac{1}{128}$	0,3437	
0,0367	$\frac{1}{256}$	0,3519	
0,0184	$\frac{1}{512}$	0,3561	
0	0	0,3632	

Wiederholung ergab . . . 69,9

mit $\frac{1}{64}$ -Norm.-HCl (Fig. 9).

g Glykokoll pro Liter	B.	Spez. Leit- fähigkeit	Gefund. Äqui- valent- gewicht
9,384	1	$0,1816 \times 10^{-2}$	100,2
7,820	$\frac{2}{3}$	0,1859	
6,704	$\frac{1}{3}$	0,1901	
5,865	$\frac{1}{6}$	0,1944	
5,214	$\frac{1}{6}$	0,1990	
4,692	$\frac{1}{3}$	0,2035	
2,346	$\frac{1}{4}$	0,2544	
1,173	$\frac{1}{3}$	0,3562	
0,5865	$\frac{1}{16}$	0,4708	
0,2933	$\frac{1}{32}$	0,5480	
0,1467	$\frac{1}{64}$	0,5908	
0,0734	$\frac{1}{128}$	0,6136	
0,0367	$\frac{1}{256}$	0,6246	
0	0	0,6361	

Wiederholung ergab . . . 98,5

Asparagin (Formelgewicht = 151,2)

mit $\frac{1}{160}$ -Norm.-NaOH (Fig. 10).

g Asparagin im Liter	B.	Spez. Leit- fähigkeit	Äqui- valent- gewicht
29,58	1	$0,3232 \times 10^{-2}$	142
24,65	$\frac{2}{3}$	0,3254	
21,13	$\frac{2}{7}$	0,3271	
18,49	$\frac{2}{5}$	0,3284	
16,44	$\frac{2}{5}$	0,3295	
14,79	$\frac{1}{3}$	0,3302	
7,395	$\frac{1}{4}$	0,3416	
3,6975	$\frac{1}{8}$	0,7143	
1,8488	$\frac{1}{16}$	0,9145	
0,9244	$\frac{1}{32}$	1,017	
0,4622	$\frac{1}{64}$	1,068	
0,2311	$\frac{1}{128}$	1,094	
0,1156	$\frac{1}{256}$	1,105	
0	0	1,124	

Wiederholung ergab . . . 143

mit $\frac{1}{160}$ -Norm.-HCl (Fig. 11).

g Asparagin im Liter	B.	Spez. Leit- fähigkeit	Äqui- valent- gewicht
29,52	1	$0,5136 \times 10^{-2}$	166
19,68	$\frac{2}{3}$	0,5661	
14,76	$\frac{1}{2}$	0,6289	
9,84	$\frac{1}{3}$	0,7768	
7,38	$\frac{1}{4}$	0,9354	
4,92	$\frac{1}{6}$	1,194	
3,69	$\frac{1}{3}$	1,367	
1,845	$\frac{1}{16}$	1,652	
0,9225	$\frac{1}{32}$	1,810	
0,4613	$\frac{1}{64}$	1,892	
0,2307	$\frac{1}{128}$	1,933	
0,1154	$\frac{1}{256}$	1,950	
0	0	1,971	

Wiederholung ergab . . . 162

mit $\frac{1}{64}$ -Norm.-NaOH (Fig. 12).				mit $\frac{1}{64}$ -Norm.-HCl (Fig. 13).			
g Asparagin im Liter	B.	Spez. Leit- fähigkeit	Äqui- valent- gewicht	g Asparagin im Liter	B.	Spez. Leit- fähigkeit	Äqui- valent- gewicht
20,78	1	$0,1092 \times 10^{-2}$	142	18,51	1	$0,1801 \times 10^{-2}$	224
13,85	$\frac{1}{2}$	0,1104		15,43	$\frac{1}{2}$	0,1869	
10,39	$\frac{1}{4}$	0,1110		13,22	$\frac{1}{4}$	0,1937	
6,927	$\frac{1}{8}$	0,1116		11,57	$\frac{1}{8}$	0,2004	
5,195	$\frac{1}{16}$	0,1119		10,28	$\frac{1}{16}$	0,2070	
2,598	$\frac{1}{32}$	0,1134		9,255	$\frac{1}{32}$	0,2142	
1,299	$\frac{1}{64}$	0,2167		4,628	$\frac{1}{64}$	0,2819	
0,6494	$\frac{1}{128}$	0,2872		2,314	$\frac{1}{128}$	0,3884	
0,3247	$\frac{1}{256}$	0,3232		1,157	$\frac{1}{256}$	0,4907	
0,1624	$\frac{1}{512}$	0,3419		0,5785	$\frac{1}{512}$	0,5587	
0,0812	$\frac{1}{1024}$	0,3517	145	0,2893	$\frac{1}{1024}$	0,5967	220
0,0406	$\frac{1}{2048}$	0,3550		0,1447	$\frac{1}{2048}$	0,6163	
0	0	0,3632		0,0724	$\frac{1}{4096}$	0,6259	
				0,0362	$\frac{1}{8192}$	0,6308	
				0	0	0,6361	

Wiederholung ergab . . . 145

Wiederholung ergab . . . 220

In der folgenden Tabelle sind die Mittelwerte der gefundenen Äquivalentgewichte für die verschiedenen Konzentrationen zusammengestellt.

Glykokoll (Formelgewicht = 75,08)			Asparagin (Formelgewicht = 151,2)	
	NaOH	HCl	NaOH	HCl
$\frac{1}{20}$ -Norm.	72,7	81,1	143	164
$\frac{1}{40}$ -Norm.	72,6	85,6	141	195
$\frac{1}{64}$ -Norm.	70,2	99,4	144	222

Aus dieser Tabelle ist ersichtlich, daß die Äquivalentgewichte gegen Natronlauge den theoretischen sehr nahe kommen, und daß sie von der Konzentration der Natronlauge (in dem untersuchten Konzentrationsintervall) unabhängig sind. Die entsprechenden Neutralisationskurven (Fig. 6, 8, 10, 12) zeigen einen von der Hydrolyse sehr wenig beeinflussten Verlauf, schließen sich also den Asymptoten der Kurven sehr gut an. Die Äqui-

valentgewichte» gegen HCl dagegen sind sämtlich zu groß und zeigen einen deutlichen Anstieg mit zunehmender Verdünnung der Salzsäure, während die Kurven (Fig. 7, 9, 11, 13) eine recht beträchtliche Hydrolyse erkennen lassen. Es ist auch leicht einzusehen, daß bei großer Hydrolyse die Äquivalentgewichte zu groß ausfallen müssen. Die Methode ist auf die Annahme gegründet, daß die geradlinigen Teile der Kurvenäste Lösungen entsprechen, in welchen durch den Überschuß des einen Bestandteils, d. h. der Säure oder der Base, die Hydrolyse vollständig zurückgedrängt ist. Wenn der eine Bestandteil sehr schwach dissoziiert ist, trifft diese Voraussetzung nicht vollständig zu, und es ist dann hauptsächlich der Einfluß der Hydrolyse auf die linke Asymptote der Kurve, welcher den Fehler bedingt. Der Schnittpunkt der Asymptote mit der Ordinatenaxe kann, da er die Leitfähigkeit der reinen NaOH (oder HCl) darstellt, nicht beeinflußt werden. Die anderen Punkte aber werden aus ihrer «Solllage» eine Verschiebung nach oben erfahren und zwar um so mehr, je tiefer sie gelegen sind. Infolgedessen erleidet die ganze Asymptote eine Drehung entgegengesetzt der Richtung des Uhrzeigersinnes, ihr Schnittpunkt mit der zweiten Asymptote wandert nach rechts und das Äquivalentgewicht wird zu groß. Zwar wird auch die rechte Asymptote in Mitleidenchaft gezogen, da sie indessen nahezu horizontal verläuft, so hat sie auf die Abszisse des Schnittpunktes und mithin auf das Äquivalentgewicht nur geringen Einfluß. Der eben geschilderte Übelstand muß sich, da die Hydrolyse um so größer ist, je verdünnter die Lösungen sind, in zunehmendem Maße mit steigender Verdünnung der verwendeten Lösungen geltend machen, und man wird deshalb ein Wachsen der Äquivalentgewichte mit der Verdünnung beobachten müssen. In Wirklichkeit ist die Hydrolyse der einzige Umstand, welcher wesentliche Fehler der beschriebenen Methode verursachen kann. Ist sie gering, was sich in den Neutralisationskurven durch ein gutes Anpassen an die Asymptoten manifestiert, so wird das gefundene Äquivalentgewicht mit dem theoretischen gut übereinstimmen und von der Konzentration der Lösungen unabhängig sein; ist sie hingegen beträchtlich und schmiegt sich die Kurve den Asymptoten

schlecht an, so wird das Äquivalentgewicht zu groß ausfallen und mit der Konzentration der verwendeten NaOH- oder HCl-Lösung variieren. Hieraus folgt der Grundsatz, speziell bei sehr schwachen Elektrolyten, möglichst konzentrierte Lösungen zu verwenden und die Messungen auf ein größeres Konzentrationsgebiet zu erstrecken. Aus der Variation der «Äquivalentgewichte», wenn eine solche vorhanden ist, läßt sich durch graphische Extrapolation mit ziemlicher Genauigkeit der richtige Wert berechnen. Fig. 14 stellt einen Versuch dar, aus den in den Versuchen mit Glykokoll und Salzsäure erhaltenen Zahlen den richtigen Wert zu ermitteln. Die gefundenen «Äquivalentgewichte» des Glykokolls sind als Ordinaten, die entsprechenden Verdünnungen der HCl als Abszissen aufgetragen. Die auf diese Weise sich ergebende Kurve ist bis zu ihrem Durchschnittspunkt mit der Ordinatenaxe, welche der Verdünnung 0, resp. der Konzentration ∞ entspricht, verlängert, und die Ordinate dieses Schnittpunktes ist als dem richtigen Äquivalentgewicht zukommend betrachtet worden. Bei der Anwendung dieses Extrapolationsverfahrens wurde von der Erwägung ausgegangen, daß die Verlängerung der Kurve in Fig. 14 die Änderung des Äquivalentgewichtes darstellen würde, falls die Salzsäure in immer größerer und zuletzt unendlich großer Konzentration, bei welcher die Hydrolyse als vollständig zurückgedrängt betrachtet werden könnte, zur Anwendung gekommen wäre. Im Falle des Glykokolls führte dieses Verfahren zu dem Äquivalentgewicht 77,5 (theoretisch = 75,08). Weniger gut war das Resultat für Asparagin, wo sich 130 statt 151 ergab.

Die am Glykokoll und am Asparagin gewonnenen Erfahrungen werden später dazu dienen, die Verhältnisse bei den Peptonen leichter beurteilen zu lassen. Vor Wiedergabe der Neutralisationsversuche an Peptonlösungen seien indessen noch einige allgemeine Bemerkungen über das graphische Extrapolationsverfahren vorausgeschickt. Dasselbe ist in der Form, wie es bisher in dieser Arbeit verwendet worden ist, streng genommen nur für einwertige Verbindungen (d. h. nur für einbasische Säuren und einsäurige Basen) gültig. Für mehrwertige Verbindungen führt es zu zu großen Äquivalent-

gewichten. Dies ist aus Fig. 14a leicht ersichtlich. Die aus geradlinigen Teilen bestehende Kurve A B C D würde die Neutralisationskurve einer schwachen zweibasischen, hochmolekularen Säure H_2A bei Wegfall der Hydrolyse darstellen. Von A bis B würde Bildung des Salzes Na_2A stattfinden, von B bis C dagegen die Bildung des sauren Salzes $NaHA$. Bei einer hochmolekularen Säure wird der Kurventeil BC nahezu horizontal verlaufen, da die Anionen A'' und HA' keine erheblich verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeiten haben werden. Von C an bis D findet wieder ein mäßiges Ansteigen der Leitfähigkeit statt, entsprechend der Zunahme der nicht zur Salzbildung verbrauchten Säure. Die experimentell bestimmte Kurve wird infolge der Hydrolyse etwa den Verlauf A E D haben. Für die Berechnung des Äquivalentgewichtes maßgebend ist die Abszisse des Punktes B, und es ist klar, daß der Schnittpunkt der Asymptoten (F) eine zu große Abszisse haben muß. Dagegen erhält man einen viel richtigeren Wert, wenn man durch den tiefsten Punkt der beobachteten Kurve (also durch P) eine Horizontale legt, ihren Schnittpunkt G mit der Asymptote A F ausfindig macht und dessen Abszisse zur Äquivalentgewichtsberechnung verwendet. Der Fehler, welcher durch die frühere Extrapolationsmethode bedingt wird, ist um so größer, je steiler die Linie C D verläuft, bei den Peptonen, bis auf die Anti-peptone, im allgemeinen ziemlich gering. Es sei noch bemerkt, daß bei vollständiger Zurückdrängung der Hydrolyse in der Nähe von A, die eine Extrapolationsmethode (Punkt F) zu große, die andere hingegen (Punkt G) zu kleine Werte liefern muß. Man müßte demnach zwei Grenzwerte erhalten, zwischen welchen der richtige liegen sollte. In Wirklichkeit wird jedoch der Hauptfehler gewöhnlich in der Ablenkung der Linie A F liegen, sodaß beide Methoden zu große Werte liefern. Im folgenden werden in der Regel die nach beiden Methoden gefundenen Werte gegeben werden. Die dem Punkt F entsprechenden Zahlen werden durch Klammern bezeichnet werden.

Für drei- und mehrwertige Verbindungen gelten selbstverständlich ganz ähnliche Betrachtungen. Das zweckmäßigste Extrapolationsverfahren ist das gleiche wie bei den zweiwertigen.

Die Anwendung der Leitfähigkeitsversuche auf die Peptone bestätigte zunächst, daß die letzteren außer Natronlauge auch Salzsäure zu binden vermögen. Es war zu erwarten, daß, wenn die Peptone einheitliche Stoffe waren, und falls die Hydrolyse die Resultate nicht stark beeinflußt hatte, die gefundenen Äquivalentgewichte gegen Natronlauge und gegen Salzsäure, für jedes Pepton in einem einfachen ganzzahligen Verhältnisse stehen würden. Wie die folgenden Messungen zeigen, hat sich diese Erwartung an sämtlichen vier gemessenen Peptonen in recht befriedigender Weise bestätigt.

Pepsinfibrinpepton α (Präparat Borkel)

mit $\frac{1}{64}$ -Norm.-NaOH (Fig. 15).				mit $\frac{1}{64}$ -Norm.-HCl (Fig. 16).			
g Pepton im Liter	B.	Spez. Leit- fähigkeit	Äqui- valent- gewicht	g Pepton im Liter	B.	Spez. Leit- fähigkeit	Äqui- valent- gewicht
33,39	1	$0,1385 \times 10^{-2}$		32,25	1	$0,1610 \times 10^{-2}$	
22,26	$\frac{2}{3}$	0,1246		21,50	$\frac{2}{3}$	0,1510	
16,70	$\frac{1}{3}$	0,1182		16,13	$\frac{1}{3}$	0,1479	
8,348	$\frac{1}{4}$	0,1105		8,063	$\frac{1}{4}$	0,1683	
4,174	$\frac{1}{6}$	0,1319	242	4,032	$\frac{1}{6}$	0,3125	367
2,087	$\frac{1}{12}$	0,2236	(254)	2,016	$\frac{1}{12}$	0,4631	(376)
1,044	$\frac{1}{24}$	0,2929		1,008	$\frac{1}{24}$	0,5469	
0,5218	$\frac{1}{48}$	0,3243		0,5040	$\frac{1}{48}$	0,5906	
0,2609	$\frac{1}{96}$	0,3395		0,2525	$\frac{1}{96}$	0,6115	
0	0	0,3632		0	0	0,6328	
Wiederholung ergab als Äquivalentgewicht . . . 255 (262)							

Verhältnis der beiden Äquivalentgewichte 2:3.

Pepsinglutenpepton α

mit $\frac{1}{64}$ -Norm. NaOH (Fig. 17).				mit $\frac{1}{64}$ -Norm.-HCl (Fig. 18)			
g Pepton im Liter	B.	Spez. Leit- fähigkeit	Äqui- valent- gewicht	g Pepton im Liter	B.	Spez. Leit- fähigkeit	Äqui- valent- gewicht
31,33	1	$0,1329 \times 10^{-2}$	317 (328)	31,35	1	$0,1581 \times 10^{-2}$	465 (476)
20,89	$\frac{2}{3}$	0,1204		20,90	$\frac{2}{3}$	0,1489	
15,87	$\frac{1}{3}$	0,1150		15,68	$\frac{1}{3}$	0,1496	
7,833	$\frac{1}{4}$	0,1091		7,838	$\frac{1}{4}$	0,2031	
3,917	$\frac{1}{6}$	0,1743		3,919	$\frac{1}{6}$	0,3788	
1,958	$\frac{1}{16}$	0,2636		1,9590	$\frac{1}{16}$	0,5022	
0,9792	$\frac{1}{32}$	0,3108		0,9797	$\frac{1}{32}$	0,5665	
0,4896	$\frac{1}{64}$	0,3357		0,4899	$\frac{1}{64}$	0,5998	
0,2448	$\frac{1}{128}$	0,3479		0,2450	$\frac{1}{128}$	0,6161	
0	0	0,3632		0	0	0,6328	

Verhältnis der Äquivalentgewichte 2 : 3.

Trypsinfibrinpepton α (Antipepton α)

mit $\frac{1}{64}$ -Norm.-NaOH (Fig. 19).				mit $\frac{1}{64}$ -Norm.-HCl (Fig. 20).			
g Pepton im Liter	B.	Spez. Leit- fähigkeit	Äqui- valent- gewicht	g Pepton im Liter	B.	Spez. Leit- fähigkeit	Äqui- valent- gewicht
24,85	1	$0,2178 \times 10^{-2}$	157 (164)	28,00	1	$0,2663 \times 10^{-2}$	290
16,57	$\frac{2}{3}$	0,1784		18,67	$\frac{2}{3}$	0,2313	
12,43	$\frac{1}{3}$	0,1577		14,00	$\frac{1}{3}$	0,2176	
6,213	$\frac{1}{4}$	0,1265		7,000	$\frac{1}{4}$	0,2374	
3,106	$\frac{1}{6}$	0,1206		3,500	$\frac{1}{6}$	0,3529	
1,553	$\frac{1}{16}$	0,2114		1,750	$\frac{1}{16}$	0,4740	
0,7766	$\frac{1}{32}$	0,2847		0,8750	$\frac{1}{32}$	0,5493	
0,3883	$\frac{1}{64}$	0,3224		0,4375	$\frac{1}{64}$	0,5894	
0,1942	$\frac{1}{128}$	0,3402		0,2188	$\frac{1}{128}$	0,6108	
0,0971	$\frac{1}{256}$	0,3496		0	0	0,6328	
0	0	0,3632					

Verhältnis der Äquivalentgewichte 1 : 2.

Trypsinfibrinpepton β (Antipepton β)mit $1,049/64$ -Norm.-NaOH (Fig. 21).

g Pepton im Liter	B.	Spez. Leit- fähigkeit	Äqui- valent- gewicht
24,50	1	$0,2140 \times 10^{-3}$	197 (210)
16,33	$2/3$	0,1791	
12,25	$1/3$	0,1621	
8,166	$1/2$	0,1458	
6,125	$1/4$	0,1382	
3,063	$1/8$	0,1753	
1,531	$1/16$	0,2738	
0,7657	$1/32$	0,3260	
0,3829	$1/64$	0,3523	
0,1915	$1/128$	0,3664	
0,0958	$1/256$	0,3733	
0	0	0,3829	

mit $1/64$ -Norm.-HCl (Fig. 22).

g Pepton im Liter	B.	Spez. Leit- fähigkeit	Äqui- valent- gewicht
36,90	1	$0,2638 \times 10^{-3}$	397
24,60	$2/3$	0,2250	
18,45	$1/3$	0,2065	
12,30	$1/2$	0,1952	
9,225	$1/4$	0,2038	
4,613	$1/8$	0,3266	
2,306	$1/16$	0,4680	
1,153	$1/32$	0,5497	
0,5766	$1/64$	0,5931	
0,2883	$1/128$	0,6150	
0	0	0,6382	

Verhältnis der Äquivalentgewichte 1:2.

Für das Pepsinfibrinpepton α wurden dieselben Versuche noch mehrfach mit technischen Präparaten durchgeführt. Es ergaben sich für die Äquivalentgewichte die Werte:

Mit $1/64$ -Norm.-NaOH

240 (249)

235 (250)

Mit $1/64$ -Norm.-HCl

351 (356)

346 (355)

350 (357)

Bei allen vier untersuchten Peptonen zeigt sich in ganz auffallender Weise ein einfaches ganzzahliges Verhältnis der Äquivalentgewichte, bei den ersten beiden 2:3, bei den zwei letzten 1:2. Diese Tatsache läßt sich am einfachsten durch die Annahme deuten, daß das Pepsinfibrinpepton und das Pepsinglutinpepton dreibasische Säuren und zweisäurige Basen sind, während die beiden Antipeptone als zweibasische Säuren und einsäurige Basen zu betrachten wären.

Die Ergebnisse der Versuche mit Glykokoll und Asparagin hätten es wünschenswert erscheinen lassen, die Leitfähigkeitsmessungen an Peptonlösungen bei mehreren namentlich größeren

Konzentrationen zu wiederholen. Leider war dies infolge Substanzmangels nur beim Pepsinfibrinpepton möglich. Die Abhängigkeit der «Äquivalentgewichte» von der Konzentration ist aus folgender Zusammenstellung ersichtlich.

$\frac{1}{320}$ -Norm.-HCl	$\frac{1}{320}$ -Norm.-HCl	$\frac{1}{64}$ -Norm.-HCl	$\frac{1}{128}$ -Norm.-HCl
344	350	349	364
	$\frac{1}{512}$ -Norm.-HCl	$\frac{1}{1024}$ -Norm.-HCl	
	410	450	
$\frac{1}{320}$ -Norm.-NaOH	$\frac{1}{320}$ -Norm.-NaOH	$\frac{1}{64}$ -Norm.-NaOH	$\frac{1}{128}$ -Norm.-NaOH
234	230	238	[233]

Mit Natronlauge konnte nur bis zur Verdünnung $\frac{1}{128}$ Mol. pro Liter gegangen werden, weil die Fehler infolge der Kohlensäureabsorption in noch verdünnten Lösungen zu groß sind. Schon der Wert für $\frac{1}{128}$ -Normalnatronlauge ist etwas unsicher und deshalb in der Tabelle eingeklammert.

Für die $\frac{1}{320}$ -Normallösungen, bei welchen die Verhältnisse am günstigsten liegen, seien hier noch die Zahlen und Kurven angegeben.

Pepsinfibrinpepton α (technisch)

mit $\frac{1}{320}$ -Norm.-NaOH (Fig. 23).				mit $\frac{1}{320}$ -Norm.-HCl (Fig. 24).			
g Pepton im Liter	B.	Spez. Leit- fähigkeit	Äqui- valent- gewicht	g Pepton im Liter	B.	Spez. Leit- fähigkeit	Äqui- valent- gewicht
77,66	1	$0,3298 \times 10^{-2}$		77,97	1	$0,4039 \times 10^{-2}$	
64,71	$\frac{5}{6}$	0,3229		64,97	$\frac{5}{6}$	0,4019	
55,47	$\frac{5}{7}$	0,3180		55,69	$\frac{5}{7}$	0,4003	
48,54	$\frac{5}{8}$	0,3140		48,73	$\frac{5}{8}$	0,4000	
43,15	$\frac{5}{9}$	0,3117		43,32	$\frac{5}{9}$	0,4008	
38,83	$\frac{1}{2}$	0,3097		38,98	$\frac{1}{2}$	0,4022	
19,42	$\frac{1}{4}$	0,3079		25,99	$\frac{1}{2}$	0,4240	
9,708	$\frac{1}{8}$	0,4665	234	19,49	$\frac{1}{4}$	0,4974	347
4,854	$\frac{1}{16}$	0,7799	(236)	9,746	$\frac{1}{8}$	1,105	(347)
2,427	$\frac{1}{32}$	0,9478		4,873	$\frac{1}{16}$	1,531	
1,214	$\frac{1}{64}$	1,032		2,437	$\frac{1}{32}$	1,750	
0,6068	$\frac{1}{128}$	1,075		1,218	$\frac{1}{64}$	1,861	
0,3034	$\frac{1}{256}$	1,097		0,6092	$\frac{1}{128}$	1,917	
0,1517	$\frac{1}{512}$	1,108		0,3046	$\frac{1}{256}$	1,946	
0	0	1,124		0	0	1,971	
Wiederholung ergab . . . 234				Wiederholung ergab . . . 340			
(236)				(340)			

Die Zusammenstellung auf Seite 238 läßt erkennen, daß die Äquivalentgewichte bei den großen Verdünnungen der Salzsäure stark veränderlich sind, daß aber in dem Intervall von $1/64$ - bis $1/20$ -normalen Lösungen die Veränderlichkeit bereits sehr gering geworden ist. Auch die Äquivalentgewichte gegen Natronlauge zeigen in demselben Intervall so gut wie keine Veränderlichkeit. Dies ist ein Hinweis darauf, daß die gefundenen Äquivalentgewichte von der Hydrolyse nicht mehr stark in Mitleidenschaft gezogen und mithin von den richtigen Werten nicht mehr weit entfernt sein können. Damit in Übereinstimmung steht, daß die Kurven, namentlich für $1/20$ -normale Lösungen, sich den Asymptoten bereits sehr gut anschließen und zwar bedeutend besser, als die Kurven für Glykokoll oder Asparagin mit Salzsäure von gleicher Konzentration. (Vergl. Fig. 7, 11, 23 und 24). Es ist daher eine sehr bedeutende Fälschung der Äquivalentgewichte durch Hydrolyse um so unwahrscheinlicher, als die Versuche mit Glykokoll und Asparagin im Mittel Werte lieferten, welche im Vergleich zu den richtigen nur um 8 resp. 9% zu groß sind. Summiert man die verschiedenen Anzeichen zusammen, so ergibt sich der Schluß, daß bei dem Pepsinfibrinpepton die geringe Veränderlichkeit der Äquivalentgewichte mit der Verdünnung (im Bereiche der größeren Konzentrationen), die nur geringe Hydrolyse andeutende Gestalt der Neutralisationskurven und schließlich das deutlich ausgesprochene Verhältnis 2:3 der Äquivalentgewichte gegen eine bedeutende Abweichung der in den konzentriertesten Lösungen gefundenen Äquivalentgewichte von den richtigen Werten sprechen. Auf die hieraus sich ergebenden Konsequenzen bezüglich des Molekulargewichtes und der Formel des Pepsinfibrinpeptons soll später (Seite 244) eingegangen werden.

Um der auf Seite 237 ausgesprochenen Ansicht über die Basizität der Peptone noch einige Stütze zu verleihen, wurde versucht, die Basizität nach der Ostwaldschen Regel,¹⁾ durch

¹⁾ Ostwald-Luther, Physiko-chem. Messungen, S. 423. — Le Blanc, Elektrochemie, 3. Aufl., S. 104.

Bestimmung der Differenz der äquivalenten Leitfähigkeiten der Natriumsalze bei den Verdünnungen 1024 und 32 zu ermitteln. Die $1/32$ -normalen Lösungen wurden synthetisch aus Pepton und Natronlauge hergestellt, und zwar enthielten die Lösungen (zur Einschränkung der Hydrolyse) einen Überschuß von mehreren Prozenten Pepton über diejenigen Mengen, welche nach den oben erwähnten Leitfähigkeitsversuchen der Natronlauge äquivalent gewesen wären. Die Lösungen reagierten trotzdem deutlich alkalisch, auch zeigen die hohen Leitfähigkeitswerte, daß die Hydrolyse nicht vollständig zurückgedrängt war. Die erhaltenen Differenzen würden allerdings ausnahmslos zugunsten der ausgesprochenen Annahmen bezüglich der Basizität sprechen.

	Pepsinfibrinpepton (Präparat Borkel)		Glutininpepton	Antipepton α	Antipepton β
λ_{1024}	101,9	106,6	105,5	90,76	104,7
λ_{32}	72,3	77,5	75,8	72,98	82,2
Differenz	29,6	29,1	29,7	17,78	22,5

Mithin würden auch diese Versuche zu dem Ergebnis führen, daß das Pepsinfibrinpepton und das Pepsinglutininpepton als Säuren dreibasisch, die beiden Antipeptone zweibasisch sind.

Mit Pepsinfibrinpepton wurde noch ein derartiger Versuch ausgeführt, doch enthielt die Lösung doppelt so viel Pepton als im vorhergehenden Versuche. Dem hiernach zu erwartenden Dinatriumsalze (an Stelle des Trinatriumsalzes) mußte eine Differenz von ca. 20 Einheiten entsprechen. In guter Übereinstimmung mit dieser Erwartung ergab sich

$$\begin{aligned}\lambda_{1024} &= 84,29 \\ \lambda_{32} &= 66,33 \\ \text{Differenz} &= 17,96\end{aligned}$$

Der Winkelblech-Bredigsche Kunstgriff der Zurückdrängung der Hydrolyse durch einen Überschuß der schwachen Säure¹⁾ war in dem vorliegenden Falle nicht anwendbar, schon aus dem einen Grunde, weil ein erheblicher Überschuß an Pepton zur Bildung saurer Salze geführt hätte. Aber auch ganz abgesehen davon würde dieses Mittel hier versagt haben. Ein Blick auf die Neutralisationskurven mit Natronlauge zeigt, daß

¹⁾ Zeitschr. f. physik. Chemie, Bd. XXXVI, S. 546.

bei Glykokoll und Asparagin die rechte Asymptote ganz wenig nach unten geneigt ist. Ein Überschuß der genannten Stoffe bringt also nur eine Zurückdrängung der Hydrolyse und keine Erhöhung der Leitfähigkeit hervor. Anders verhalten sich die Peptone. Hier zeigen die rechten Asymptoten der Neutralisationskurven, speziell bei den verdünnteren Lösungen einen sehr merklichen Anstieg, also eine Erhöhung der Leitfähigkeit durch einen Peptonüberschuß. Man wäre daher durch Anwendung des Bredigschen Verfahrens zu viel zu großen Werten gelangt.

In Zusammenhang mit dem Gesagten steht, daß die Lösungen mit größerem Peptonüberschuß sauer reagierten, während selbst die Lösungen mit den größten verwendeten Überschüssen an Glykokoll oder Asparagin immer noch stark bläuend auf Lackmuspapier wirkten. Man wird hieraus schließen dürfen, daß die Peptone stärkere Säuren sind als Glykokoll und Asparagin. Daß die Neutralisationskurven der Peptone trotzdem eine größere Hydrolyse zeigen, dürfte in der Mehrwertigkeit derselben seinen Grund haben, da die Salze mehrbasischer Säuren (resp. mehrsauriger Basen) bekanntlich mehr hydrolysiert sind, als solche einwertiger.

Im allgemeinen ist zu den Leitfähigkeitsmessungen zu bemerken, daß sich die beobachteten Leitfähigkeitswerte ausnahmslos momentan einstellten, ebenso wie bei den Versuchen mit Eialbumin von Sjöqvist¹⁾ und von Ladislaus v. Rohrer.²⁾ Diese Tatsache, namentlich aber der Umstand, daß sämtliche Peptonsalze große Hydrolyse zeigen, wie sie den Salzen schwacher Säuren oder Basen zukommt, ist als Beweis dafür anzusehen, daß die Peptone nicht zu der Klasse der Pseudosäuren und Pseudobasen³⁾ gehören. Ein gleiches gilt vom Kreatin. Auch hier waren die Leitfähigkeitswerte der salzsauren Lösungen von der Zeit unabhängig und die Salzsäure konnte (wie es die sehr große Hydrolyse, auf welche die Neutralisationskurve hin-

¹⁾ loc. cit.

²⁾ Archiv für d. ges. Physiologie, Bd. XC, S. 368 (1902).

³⁾ A. Hantzsch, Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Bd. XXXII, 1, S. 575 (1899); Bd. XXXII, 3, S. 3066 (1899).

deutete, vermuten ließ) mit Barytwasser und Phenolphthalein zurücktitriert werden. Amphoterer Charakter zeigte das Kreatin nicht.

Es blieb noch wünschenswert, nachzuweisen, daß die Peptone durch Natronlauge und durch Salzsäure unter den Verhältnissen, wie sie bei den Leitfähigkeitsmessungen vorlagen, keinerlei tiefgreifende Veränderung erleiden. Zu diesem Zwecke wurden gleiche Mengen von Peptonlösung, Salzsäure und Natronlauge gemischt. (Salzsäure und Natronlauge waren einander äquivalent.) Das erste Mal wurde zur Peptonlösung zunächst die Natronlauge und erst nach zirka einer Stunde die Salzsäure hinzugefügt; das zweite Mal geschah der Zusatz in umgekehrter Reihenfolge, und das dritte Mal wurden Salzsäure und Natronlauge gemischt, bevor sie zur Peptonlösung hinzugesetzt wurden. In allen drei Fällen ergab sich die gleiche Leitfähigkeit. Wäre außer dem (umkehrbaren) Neutralisationsprozeß noch eine chemische Umwandlung der Peptone vor sich gegangen, so hätte sich dies wahrscheinlich durch eine Änderung des Leitvermögens verraten.

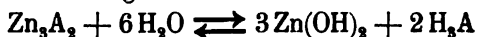
Molekulargewichte und Formeln. Vor der Erörterung der Folgerungen, welche hinsichtlich der Molekulargewichte und der Formeln der Peptone aus den Leitfähigkeitsversuchen zu ziehen sind, seien noch einige Bemerkungen über die auf Seite 217 angegebenen Formeln und ihre Grundlagen vorausgeschickt.

Für die Wahl dieser Formeln waren maßgebend gewesen:

1. Die Resultate der Elementaranalyse der Peptone.
2. Die Zusammensetzung der Baryum- und Zinksalze.

Den unter 1. angeführten Resultaten wurde mit Recht von jeher keine entscheidende Bedeutung für die Wahl der Formel beigemessen, weil bei so hochmolekularen Stoffen die Genauigkeit der Elementaranalyse nicht mehr ausreicht, um die Aufstellung einer bestimmten Formel zu gestatten. Im wesentlichen stützten sich also die Formeln auf die Zusammensetzung der Baryum- und Zinksalze. Sehr zugunsten dieser Salze sprach, daß der Zinkgehalt des einen dem Baryumgehalt des anderen äquivalent war und weiter, daß bei den verschiedenen Darstellungen Salze von gleicher Zusammensetzung gewonnen wurden. Trotz dieser

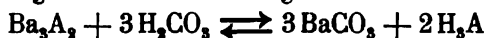
unzweifelhaft Vertrauen erweckenden Umstände legen die hier mitgeteilten Versuche einen sehr wesentlichen Einwand gegen die beiden Salze nahe. Die Neutralisationskurven der Peptone mit NaOH zeigen durchwegs eine bedeutende Hydrolyse der Natriumsalze an. Die Baryumsalze müssen daher ebenfalls sehr stark hydrolysiert sein und in noch viel höherem Maße wird dies bei den Zinksalzen zutreffen, weil Zinkhydroxyd als äußerst schwache Base mit der ebenfalls sehr schwachen «Peptonsäure» nur unvollkommene Salzbildung eingehen wird. Das Pepton als dreibasische Säure betrachtend (für die folgenden Betrachtungen ist übrigens die Basizität prinzipiell gleichgültig), wollen wir es mit H_3A bezeichnen. Aus den eben angestellten Erwägungen würde folgen, daß, falls wir das normale Zinksalz (Zn_3A_2) (sofern dessen Darstellung überhaupt möglich wäre) in Wasser zu lösen versuchten, folgender Vorgang bis zur Erreichung eines Gleichgewichtes stattfinden würde:



und da das $Zn(OH)_2$ eine geringe Löslichkeit besitzt, würde dasselbe fest ausgeschieden werden. Die Lösung würde demnach weniger Zink enthalten, als dem Pepton in Wirklichkeit äquivalent ist.

Bei der Darstellung der Zinksalze wurde nun so verfahren, daß ZnO mit Peptonlösung aufgekocht wurde, und daß die resultierende Lösung nach dem Filtrieren entweder eingedampft oder nach dem Einengen mit Alkohol gefällt wurde. Es wurde also bei der Darstellung von den Stoffen ausgegangen, welche in obiger Gleichung auf der rechten Seite stehen, und es ist klar, daß wir auf diese Weise bestenfalls zu einer Lösung gelangen können, die der vorhin durch Auflösen von normalem Zinksalz erhaltenen gleich ist, also ebenfalls einen zu niedrigen Zinkgehalt aufweist, und zwar müßte es direkt ein Zufall sein, wenn Zink- und Peptongehalt der Lösung in einem stöchiometrischen Verhältnis zu einander stünden. Der gleiche Einwand wie die Lösung trifft auch ihr Eindampfungsprodukt, und auch das mit Alkohol gefällte Zinksalz unterliegt ähnlichen Bedenken, da das in absolutem Alkohol unlösliche Pepton mit dem Salz mitgefällt werden dürfte.

Ähnliche Einwände lassen sich gegen das Baryumsalz erheben. Dargestellt wurde dasselbe durch Zusatz von $\text{Ba}(\text{OH})_2$ und Ausfällen des «überschüssigen» Baryumhydroxyds durch Einleiten von Kohlensäure. Auch hier dürfte man zu einem Gleichgewichtszustand gelangen, der etwa durch folgende Gleichung ausgedrückt werden mag:



und auch hier braucht der endgültige Baryumgehalt der Lösung in keinem stöchiometrischen Verhältnis zu ihrem Peptongehalt zu stehen.

Daß die Salze bei den verschiedenen Darstellungen gut übereinstimmende Werte lieferten, wird eine Erklärung wohl darin finden, daß bei der Spärlichkeit des Materials für die Darstellungsversuche hauptsächlich der Gesichtspunkt der guten Ausbeute maßgebend gewesen sein dürfte, wodurch die Konzentrationsbedingungen in ziemlich gleichmäßiger Weise geregelt wurden.

Wenn nun in den folgenden Erörterungen ein Widerspruch zwischen der wahrscheinlichsten Deutung der Neutralisationsversuche und den auf Seite 3 angegebenen Formeln zutage tritt, so wird man nach den obigen Ausführungen diese Deutung hierdurch noch nicht als widerlegt erachten dürfen.

Nimmt man die für das Pepsinfibrinpepton aufgestellte Behauptung, daß es eine dreibasische Säure und eine zweisäurige Base sei (Seite 237), als zutreffend an, so folgt, daß das Molekulargewicht das Dreifache des Äquivalentgewichtes gegen Natronlauge und das Doppelte desjenigen gegen Salzsäure sein muß. Unter der Voraussetzung, daß die in den $\frac{1}{20}$ -normalen Lösungen ermittelten Äquivalentgewichte (Seite 238) richtig sind, gelangt man zu den Werten 702 resp. 688. Aus der von Borkel und von Mühle dem Pepsinfibrinpepton zugeschriebenen Formel $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{N}_6\text{O}_9$ (Seite 217) würde ein Formelgewicht von 515 (oder einem ganzzahligen Vielfachen davon) folgen. Wenn auch zugegeben ist, daß die nach der Leitfähigkeitsmethode selbst in den $\frac{1}{20}$ -normalen Lösungen gefundenen Äquivalentgewichte noch etwas zu groß sein können, so kann dieser Fehler doch nicht über 30% betragen, wie dies der Fall sein müßte, wenn das

Molekulargewicht 515 wäre. Dieser letztere Wert erscheint demnach als ausgeschlossen.

Noch eine Möglichkeit bliebe übrig, die Mühle-Borkelsche Formel mit den Ergebnissen der Leitfähigkeitsversuche in Einklang zu bringen. Schreibt man nämlich dem Pepsinfibrinpepton die doppelte Formel $(C_{21}H_{34}N_6O_9)_2$ zu und betrachtet es als fünfbasische Säure und dreisäurige Base, so gelangt man zu dem Molekulargewicht 1030 und zu den beiden Äquivalentgewichten 206 und 343. Experimentell gefunden wurden 234 und 344. Die Abweichung zwischen dem gefundenen und dem berechneten Äquivalentgewicht gegen Natronlauge (234 und 206) ist recht beträchtlich, würde aber eventuell noch durch die Versuchsfehler zu rechtfertigen sein. Indessen wird diese Interpretation dadurch sehr unwahrscheinlich gemacht, daß die Basizitätsbestimmungen nach der Ostwaldschen Regel (Seite 240) ebenso wie das Verhältnis der beiden Äquivalentgewichte auf eine dreibasische Säure hindeuten. Wegen der Hydrolyse der Salze hätte man nach dieser Regel eher zu hohe als zu niedrige Werte für die Basizität erwarten sollen. Alles in allem führen die verschiedenen Leitfähigkeitsversuche zu dem Schluß, daß dem Pepsinfibrinpepton am wahrscheinlichsten eine zu einem Molekulargewicht von 650—700 führende Formel zukommen dürfte.

Durch Gefrierpunktsbestimmungen läßt sich die Frage nicht entscheiden. Molekulargewichtsbestimmungen in wässerigen Lösungen, von Herrn Prof. Siegfried und seinen Schülern ausgeführt, schienen allerdings fast ausnahmslos, d. h. bei sämtlichen Peptonen in guter Übereinstimmung mit den aufgestellten Formeln zu stehen. Die folgende Zusammenstellung enthält die gefundenen Werte:

Antipepton α	im Mittel	292	(Formelgewicht 259)
„ β	„	286	273
Pepsinfibrinpepton α	„	551	515
Pepsinglutinpepton	„	558	573

Eigene Messungen am Pepsinfibrinpepton ergaben ganz ähnliche Zahlen. Nun müssen aber die Resultate der Gefrierpunktsbestimmung in diesem Falle mit großer Reserve betrachtet werden, denn, wie bereits Herr Prof. Siegfried und seine

Schüler hervorgehoben haben, üben bei der Größe der Molekulargewichte schon verhältnismäßig geringfügige Verunreinigungen einen beträchtlichen Einfluß aus.

Nachdem die Ergebnisse der Neutralisationsversuche mit ziemlicher Sicherheit auf die Gegenwart solcher, das Molekulargewicht erniedrigender Verunreinigungen hingedeutet hatten, lag zunächst der Verdacht nahe, daß von der Darstellung der Peptone her Salze in ihnen zurückgeblieben sein müßten. Es wurde deshalb versucht, aus der Leitfähigkeit der zur Molekulargewichtsbestimmung verwendeten Lösung den Betrag der vermuteten salzartigen Verunreinigungen zu schätzen.

Es wurden 1,8000 g Pepton in 20 ccm Wasser gelöst. Die Gefrierpunktserniedrigung betrug 0,289°. Daraus würde sich ohne Korrektur ein Molekulargewicht von 576 berechnen. Die spez. Leitfähigkeit der Lösung betrug $0,1667 \times 10^{-2}$. Schriebe man diese Leitfähigkeit ausschließlich Salzen zu, so ließe sich allerdings eine Ionenkonzentration berechnen, welche ausreichen würde, um das nach den Neutralisationsversuchen erwartete Molekulargewicht auf 576 zu erniedrigen. Aber ganz abgesehen davon, daß von demjenigen Salz, welches der Darstellungsmethode nach am allerehesten zu vermuten gewesen wäre, nämlich von Ammoniumsulfat, durch Neßlers Reagens und durch Baryumchlorid nicht die geringste Spur nachgewiesen werden konnte, ließe sich ein derartig hoher Salzgehalt auf keinen Fall mit dem fast horizontalen Verlauf der rechten Kurvenäste in den Fig. 23 und 24 vereinbaren. Aus letzterem Umstande wäre im Gegenteil zu folgern, daß die Peptone oder wenigstens das hier untersuchte Präparat so gut wie salzfrei sind. Die beobachtete Leitfähigkeit wird demnach nur auf das Konto einer Ionisation der Peptone nach dem Schema 3 auf Seite 220 zu setzen sein. Ein Blick auf diese Gleichung zeigt, daß eine derartige Ionisation wohl elektrische Leitfähigkeit, nicht aber eine Änderung der Gefrierpunktsdepression hervorrufen wird.

War also die Gegenwart von Salzen ausgeschlossen, so mußte für die Molekulargewichtsfälschung ein Nichtelektrolyt von geringem Molekulargewicht verantwortlich gemacht werden. Das Vorhandensein eines solchen wird nun allerdings durch

die Darstellungsweise der Peptone äußerst wahrscheinlich gemacht. Dieselben werden nämlich durch Alkohol gefällt, und wenn man in Betracht zieht, daß sie ein überaus feinkörniges und leichtes Pulver darstellen, also eine sehr große Oberfläche besitzen, so ist es nur wahrscheinlich, daß sie den Alkohol hartnäckig adsorbieren. Tatsächlich ist es auch Herrn Prof. Siegfried gelungen, selbst in gut getrockneten Präparaten solchen nachzuweisen, und auch die früher erwähnte Tatsache, daß es beim Trocknen der Peptone nie gelingen wollte, ein völlig konstantes Gewicht zu erzielen, steht hiermit in Übereinstimmung.

Betrüge der richtige Wert des Molekulargewichtes des Pepsinfibrinpeptons 690, wie es den Neutralisationsversuchen ungefähr entsprechen würde, so müßte man dem Präparat, das zu obiger Gefrierpunktsbestimmung verwendet wurde, den nicht gerade unmöglichen Alkoholgehalt von 1,4% zuschreiben. Die doppelte Mühle-Borkelsche Formel, also ein Molekulargewicht von 1030, würde einen Alkoholgehalt dieses Präparates von 3,7% erfordern.

Was die übrigen drei Peptone anbetrifft, so kann hier nur mit der größten Reserve geurteilt werden, weil infolge Substanzmangels die Leitfähigkeitsversuche nur bei einer einzigen und überdies ungünstig großen Verdünnung ausgeführt werden konnten. Gefrierpunktsbestimmungen mußten ganz unterbleiben. Nur im Falle des Antipeptons α war es möglich, außer den bereits angeführten Versuchen mit $\frac{1}{64}$ -Normallösungen, einen solchen mit $\frac{1}{80}$ -Normalnatronlauge auszuführen. Die früher ausgesprochene Ansicht, daß dieses Pepton eine zweibasische Säure und eine einsäurige Base ist, führt unter Voraussetzung der Richtigkeit der ihm zugeschriebenen Formel $C_{10}H_{17}N_3O_5$ zu dem Wert 259 für das Äquivalentgewicht gegen HCl und 130 für dasjenige gegen NaOH.

Gefunden wurde:

	$\frac{1}{64}$ -Norm.	$\frac{1}{80}$ -Norm.	Berechnet
NaOH	157 (164)	153 (156)	130
HCl	290	—	259

Die Abweichung zwischen den gefundenen und den berechneten Werten ist in diesem Falle nicht so groß, daß die Leitfähigkeitswerte als mit der Formel unvereinbar betrachtet werden müßten.

Hervorgehoben sei, daß die dem Antipepton α zugeschriebene Wertigkeit als Säure und als Base durch frühere Versuche von Herrn Prof. Siegfried bestätigt werden. Bei seinen Arbeiten über Fleischsäure,¹⁾ die sich später als mit dem Antipepton α identisch erwies, hatte er ein Silbersalz und ein Hydrochlorid derselben dargestellt, von denen das erste 2 Äquivalente Silber, das letztere ein Mol. Salzsäure auf ein Formelgewicht enthielt. Das Silbersalz zeigte eine Addition von 2 Molekülen Wasser. Insofern das Silbersalz schwer löslich ist, ist es nicht den gleichen Bedenken unterlegen, wie die früher erwähnten Baryum- und Zinksalze. Weniger verlässlich allerdings erscheint das Hydrochlorid.

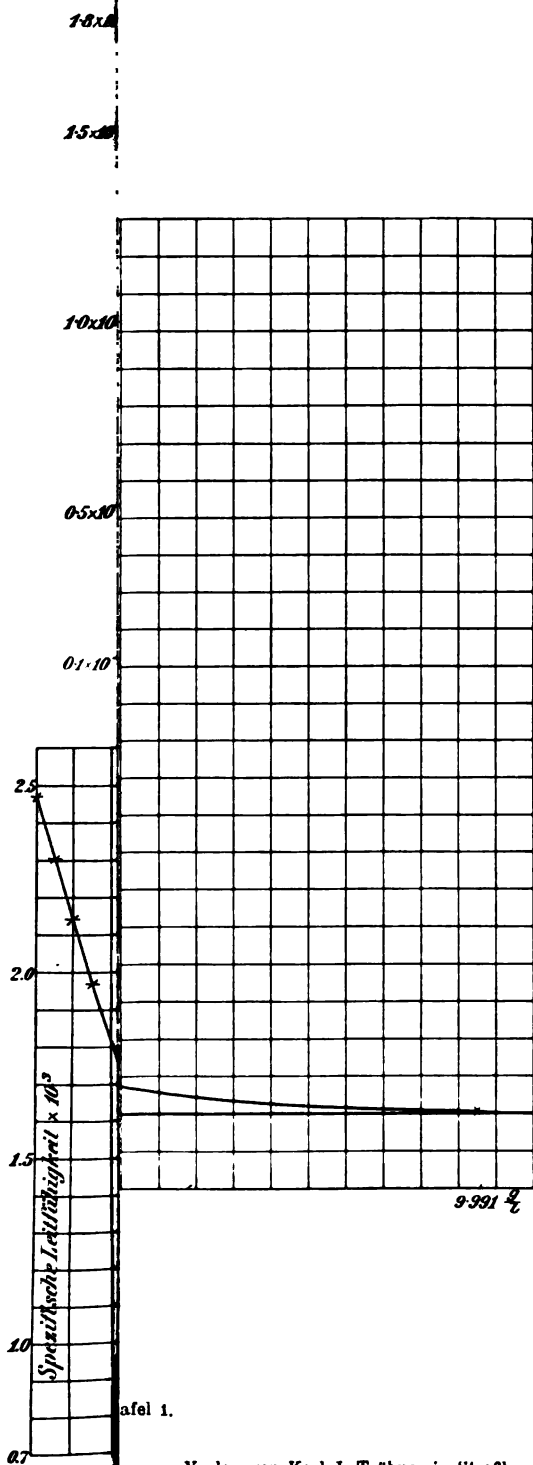
Weit größer, als beim Antipepton α sind die Abweichungen zwischen den von der Formel und den von den Leitfähigkeitswerten hergeleiteten Molekulargewichten beim Antipepton β und am größten sind sie beim Pepsinglutinpepton. Bei diesem würde nach den Leitfähigkeitswerten ein Molekulargewicht von ca. 900 zu erwarten sein, während die Formel ein solches von 573 (oder ein Vielfaches davon) verlangt.

Es wäre wünschenswert gewesen, für die zuletzt genannten drei Peptone die Untersuchung in dem gleichen Umfange durchzuführen, wie für das Pepsinfibrinpepton, doch mußte, da die Substanz dazu nicht ausreichte, darauf verzichtet werden. Das gleiche gilt von Diffusionsversuchen, welche außer ihrem physiologischen Interesse noch deshalb von Interesse gewesen wären, weil sich aus ihnen Schlüsse über die Größe der Molekulargewichte hätten ziehen lassen.²⁾ Bei dem Mangel einer guten quantitativen Bestimmungsmethode für die Peptone hätten diese Versuche mit so großen Mengen ausgeführt werden müssen, daß sie selbst für das Pepsinfibrinpepton undurchführbar waren.

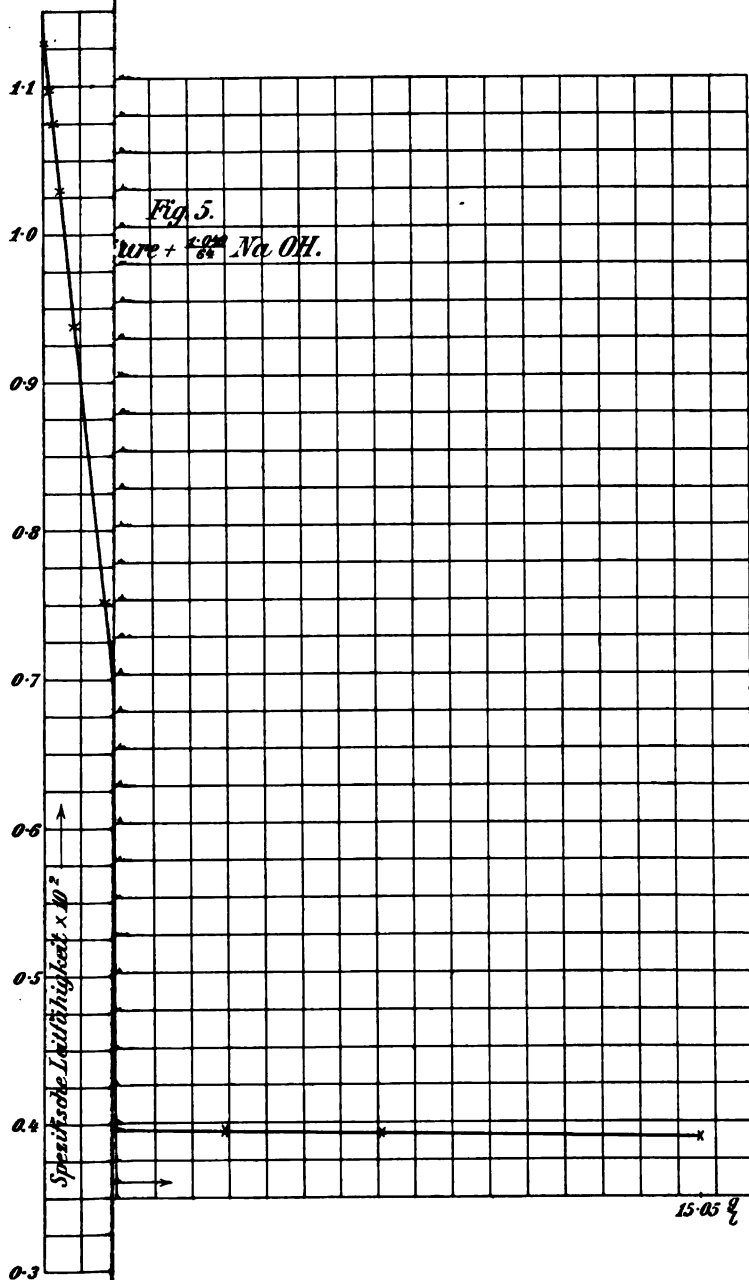
Es wäre weiterhin wünschenswert gewesen, etwas Be-

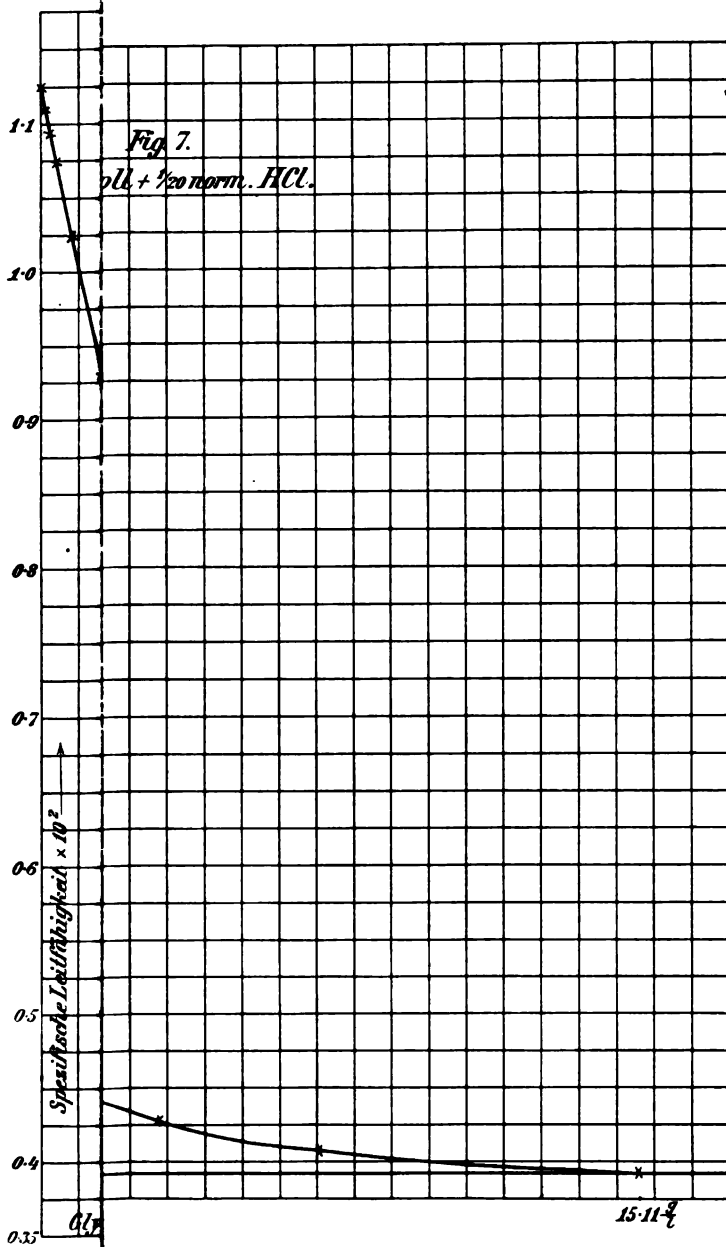
¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXVII, 3., S. 2762 (1894).

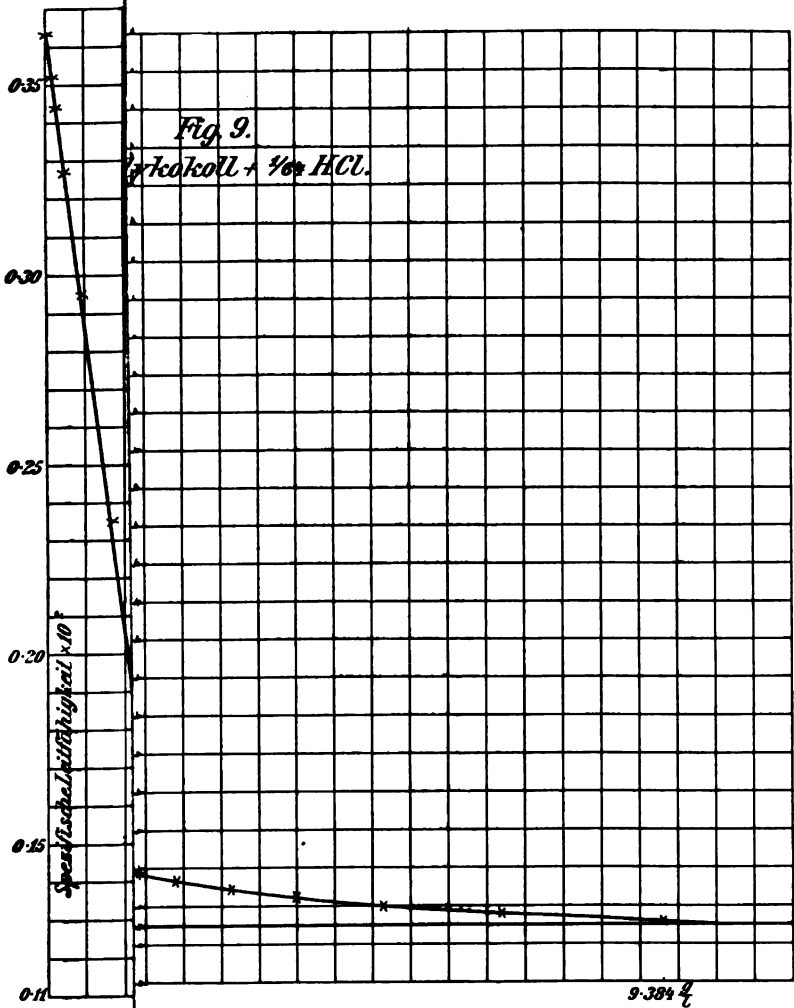
²⁾ M. Thovet, Comptes rendus, Bd. CXXXV, S. 579 (1902).

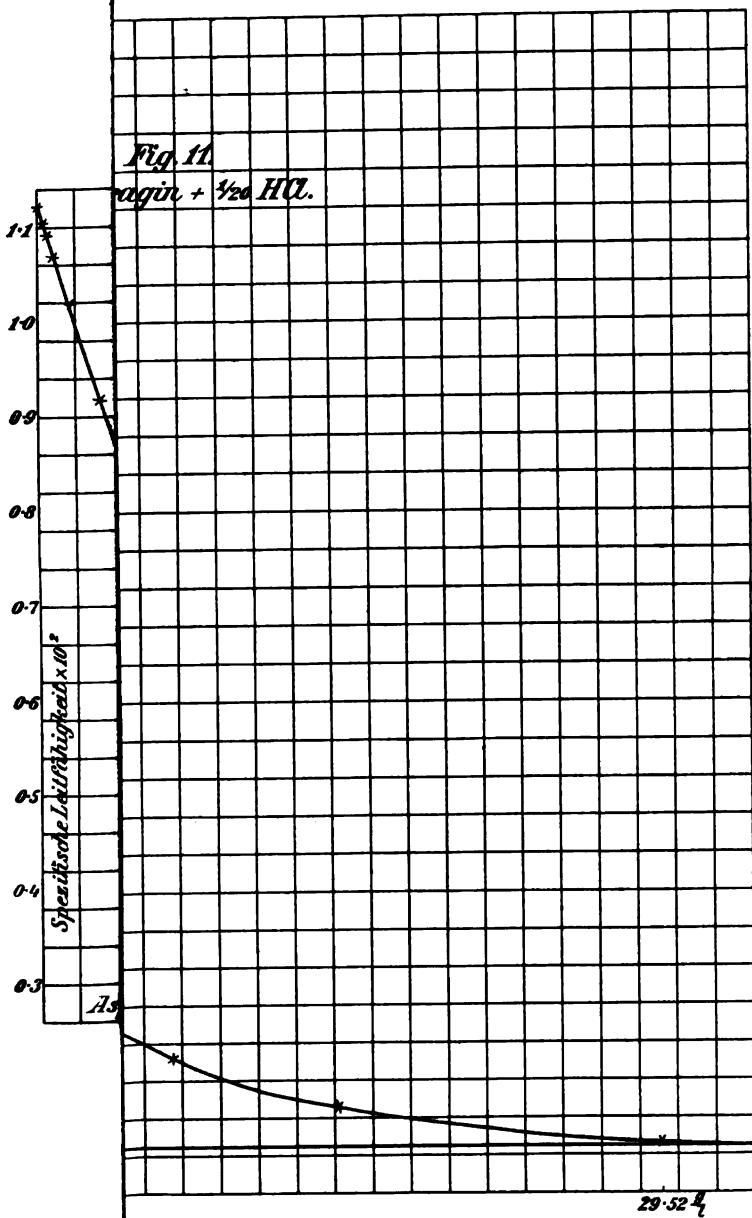


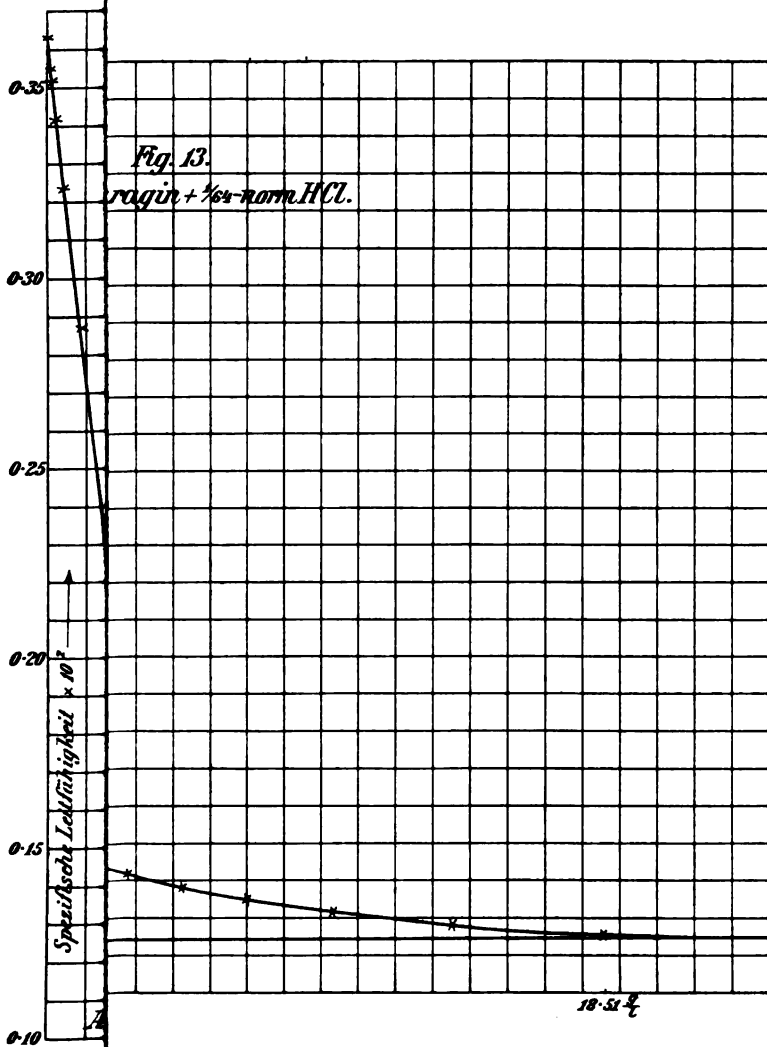
afel 1.







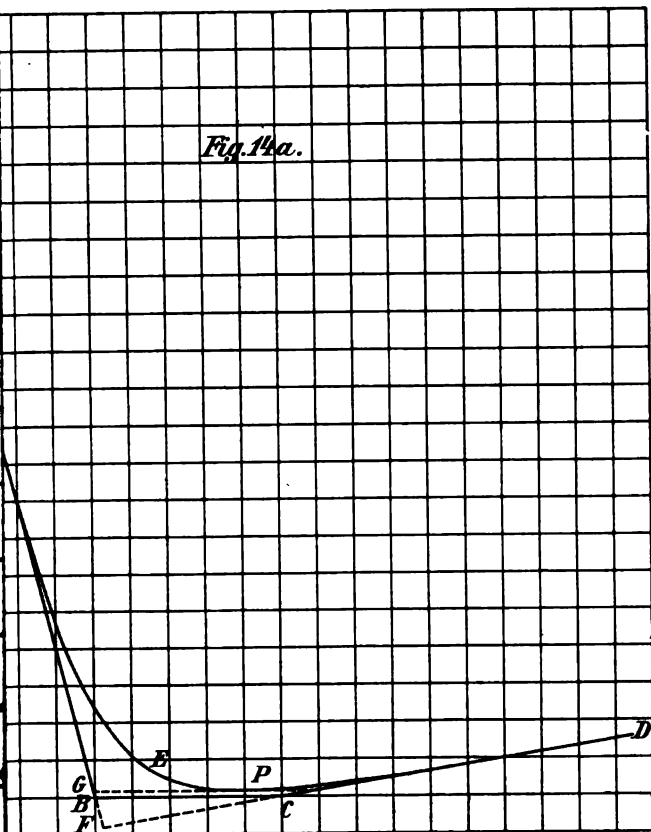




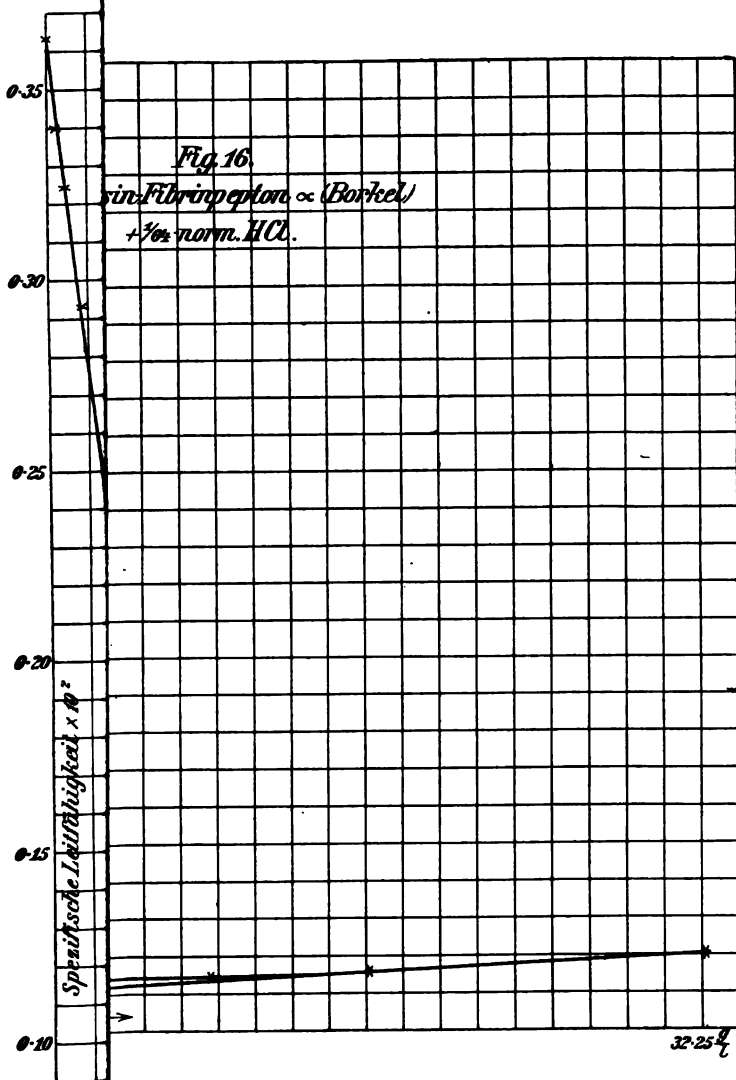
Äquivalenzgewicht (gefunden.) von Glykoll

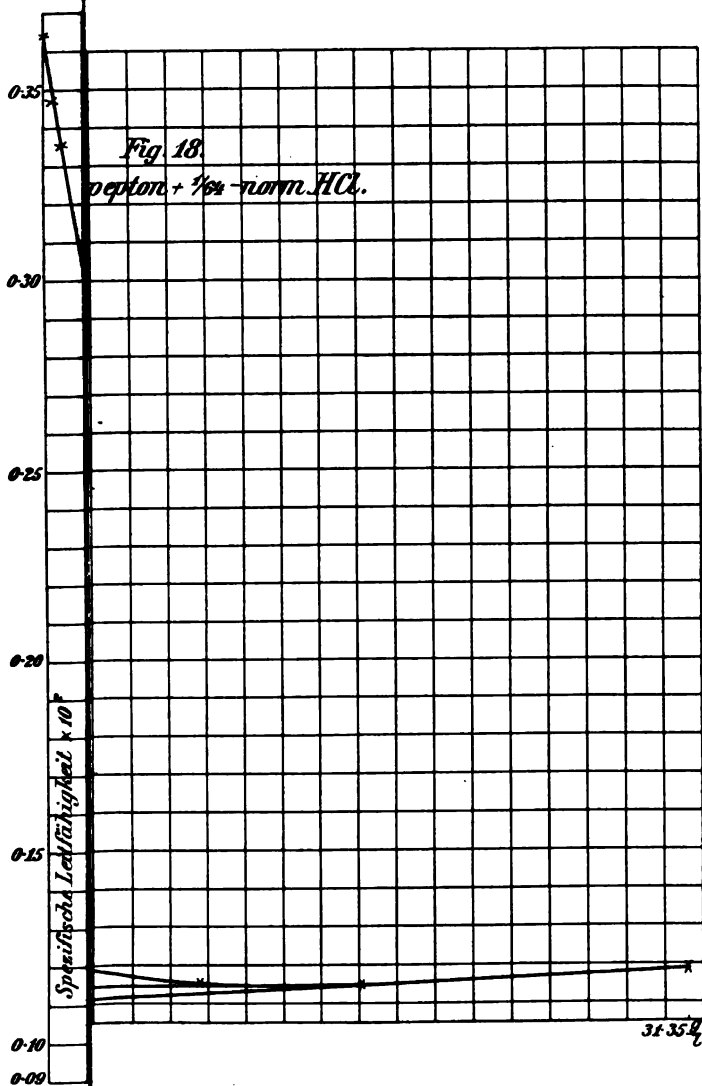
100
90
80
70

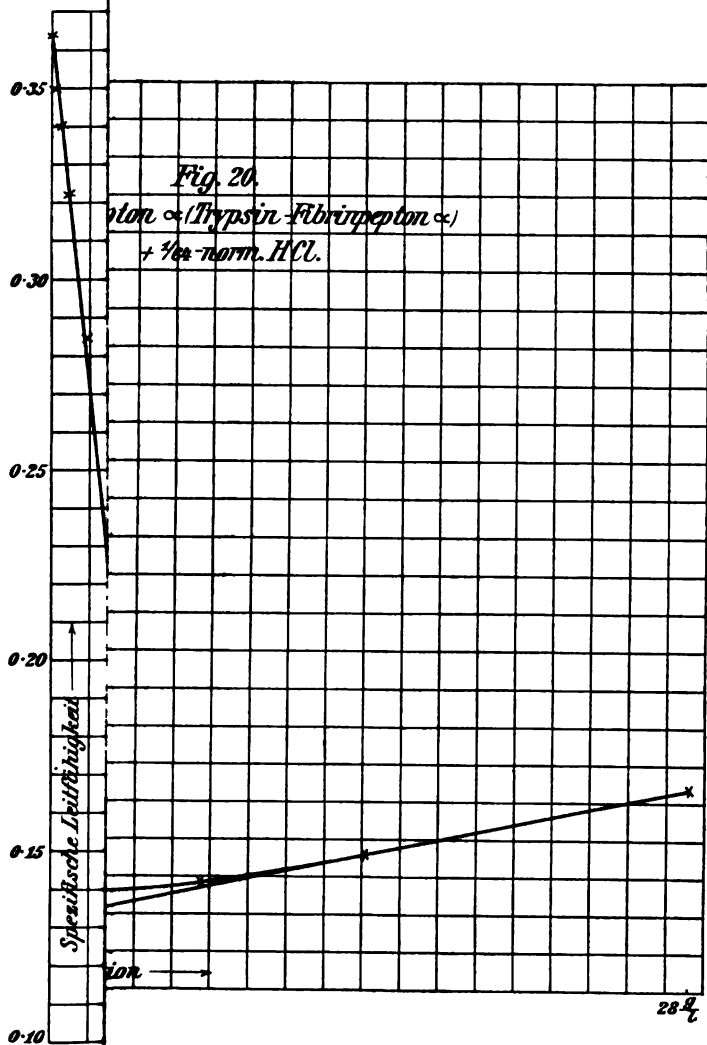
Fig. 14a.

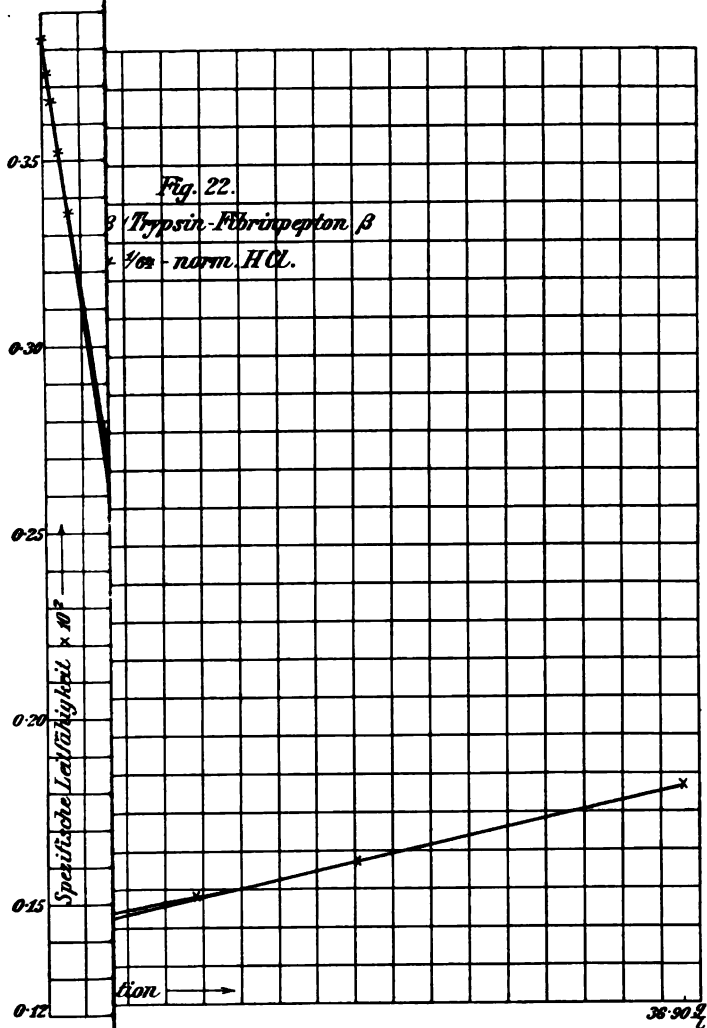


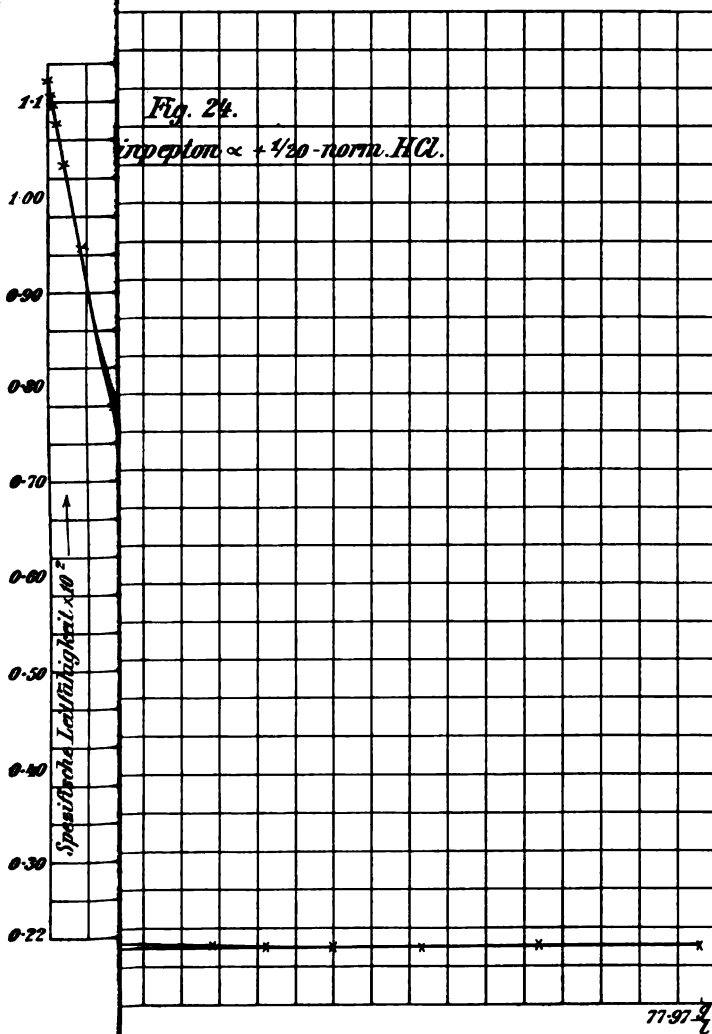
1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100.











stimmtes über die Stärke der Peptone als Säuren und als Basen festzustellen. Das einzige, was indessen in dieser Beziehung bisher erreicht werden konnte, ist die ungefähre Berechnung der Basendissoziationskonstanten der beiden Antipeptone. Da diese letzteren einsäurige Basen sind, so kann man aus der Hydrolyse ihrer Hydrochloride die Affinitätskonstanten angenähert berechnen. Es ergab sich auf diese Weise, daß die Basenkonstante des Antipeptons α ca. 700 mal so groß als das Ionenprodukt des Wassers ($1 \cdot 2 \times 10^{-14}$) ist, und daß die entsprechende Konstante des Antipeptons β ca. das 1200fache des letzteren Wertes beträgt.

Wenn man bedenkt, daß selbst bei den einfachsten amphoteren Stoffen (den zugleich einbasischen und einsäurigen) unsere Kenntnis der Gleichgewichtsverhältnisse noch eine sehr mangelhafte ist, obgleich die neueren Arbeiten von Walker hierin einen namhaften Fortschritt bedeuten, so kann es nicht wundernehmen, daß die Schwierigkeiten bei einem Stoffe, der 3 H-Ionen und 2 OH-Ionen abzuspalten imstande ist, vorläufig unüberwindlich sein mußten. Überhaupt dürfte unter den bisher bekannten gut definierten amphoteren Stoffen der organischen Chemie das Pepsinfibrin- und das Pepsinglutinpepton die kompliziertesten sein. Gerade bei der Untersuchung ähnlicher, verwickelter Fälle wird die hier angewendete Methode in Zukunft wohl noch gute Dienste leisten.

Die Alkalisalze des Wasserstoffsuperoxyds.

Zum Schlusse sei noch kurz auf die Anwendung der „Leitfähigkeitsmethode“ auf Gemische von Wasserstoffsuperoxyd und Alkalilösungen eingegangen. Herr Prof. Luther machte mich darauf aufmerksam, daß Calvert¹⁾ ähnliche Neutralisationskurven, wie die hier beschriebenen, für Wasserstoffsuperoxyd und die Alkalihydroxyde bestimmt hatte. Calvert hat aus diesen Versuchen nur Schlüsse über die Wanderungsgeschwindigkeit des Wasserstoffperoxydanions gezogen. Indessen läßt sich das in dieser Arbeit angewendete graphische Extrapolations-

¹⁾ Calvert, Zeitschr. f. physik. Chem., Bd. XXXVIII, S. 513 (1901).

verfahren auch hier mit Nutzen anwenden, und es läßt sich daher auf diese Weise das Basenbindungsvermögen des Wasserstoffsuperoxyds ermitteln. Die folgende Zusammenstellung gibt die Äquivalentgewichte des Wasserstoffperoxyds in Molekülen dieses Stoffes an, welche sich bei den verschiedenen Verdünnungen von LiOH und NaOH ergaben:

| | $\frac{1}{4}$ -Norm. | $\frac{1}{2}$ -Norm. | $\frac{1}{10}$ -Norm. | $\frac{1}{20}$ -Norm. |
|------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| LiOH | 0,96 | 1,00 | 1,06 | 1,26 |
| NaOH | 1,00 | 1,04 | 1,14 | 1,52 |

Wie man aus dieser Tabelle und noch deutlicher aus Figur 25 ersieht, kommt bei der Salzbildung ein Molekül H_2O_2 auf ein Molekül Alkalihydroxyd. Das entsprechende Natriumsalz NaO_2H ist in fester Form bereits seit langem bekannt. Nachdem durch Calvert auf andere Weise festgestellt worden ist, daß auch ein Salz NaO_2 (3 Moleküle H_2O_2 auf 2 Moleküle NaOH) existiert, so ist anzunehmen, daß letzteres in Lösungen mit H_2O_2 -Überschuß, ersteres hingegen in solchen mit Alkaliüberschuß besteht.

Zusammenfassung.

Der Inhalt der vorliegenden Arbeit ist kurz zusammengefaßt folgender:

Es ist die elektrische Leitfähigkeit der Peptone und für eins derselben, durch Messung elektromotorischer Kräfte, die Wasserstoffionkonzentration bestimmt worden.

Die Anwendbarkeit der elektrischen Leitfähigkeit zur Bestimmung der Äquivalentgewichte schwacher Säuren und Basen ist eingehend diskutiert worden.

Die Anwendung dieser Methode hat zunächst eine neue Stütze für die Annahme geliefert, daß die von Herrn Prof. Siegfried dargestellten Peptone einheitliche Stoffe seien.

Des weiteren hat sie es zumindest sehr wahrscheinlich gemacht, daß das Pepsinfibrinpepton und das Glutininpepton dreibasische Säuren und zweisäurige Basen sind, und daß die beiden Antipeptone zweibasische Säuren und einsäurige Basen darstellen.

Es ist erwiesen worden, daß die Peptone nicht zu den Pseudosäuren und Pseudobasen gehören und daß die Einwirkung

von verdünnten Säuren und Alkalien in einem einfachen Neutralisationsprozesse, nicht aber in einer tiefer greifenden Zersetzung besteht.

Im Anschluß an die Leitfähigkeitsmessungen an den Peptonen ist an der Hand der Calvert'schen Messungen gezeigt worden, daß sich das Wasserstoffsuperoxyd in alkalischen Lösungen wie eine einbasische Säure verhält.

Am Schlusse dieser Arbeit sei es mir gestattet, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Ostwald, für die erteilten Ratschläge und das jederzeit bewiesene Wohlwollen aufrichtigen Dank zu sagen.

Herrn Prof. Siegfried, durch dessen freundliches Entgegenkommen diese Arbeit ermöglicht wurde, und Herrn Privatdozent Dr. Böttger bin ich ebenfalls für jederzeit gern gespendeten Rat zu herzlichem Dank verpflichtet.

Auch Herrn Subdirektor Prof. Luther und Herrn Dr. Drucker, namentlich aber Herrn Dr. Freundlich sei an dieser Stelle für das vorliegender Arbeit gewidmete Interesse mein wärmster Dank ausgesprochen.

Zur Kenntnis der Peptone.

Von

M. Siegfried.

(Der Redaktion zugegangen am 21. Mai 1905.)

Die vorstehend mitgeteilte Untersuchung des Herrn W. Neumann hat für das Pepsinfibrinpepton α ,¹⁾ Pepsin-glutinpepton,²⁾ Antipepton³⁾ α und β (Trypsinpepton α und β) das Verhältnis der H- und OH'-Ionen festgestellt und für alle untersuchten Peptone das mit meinen früheren Befunden übereinstimmende Resultat ergeben, daß die Peptone ausgesprochene Säuren sind. In den Antipeptonen ist das Verhältnis $\frac{H'}{OH'} = 2$, in den beiden untersuchten Pepsinpeptonen $\frac{3}{2}$. Nach unserer Kenntnis des Eiweißmoleküls ist anzunehmen, daß diesen OH'-Ionen NH₂-Gruppen, den H-Ionen in der Hauptsache COOH-Gruppen entsprechen, sodaß in den Antipeptonen auf 1-NH₂-Gruppen 2-COOH, in den Pepsinpeptonen auf 2-NH₂-Gruppen 3-COOH-Gruppen als wahrscheinlich anzunehmen sind. Diese durch Herrn Neumann gewonnenen Resultate bedeuten einen wesentlichen Fortschritt in der Erkenntnis der Konstitution der Peptone.

Es fragt sich: Lassen sich aus ihnen bestimmte Schlüsse auf die Molekulargröße der Peptone ziehen?

¹⁾ M. Siegfried, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIII, S. 3568; P. Mühle, Diss. Leipzig 1901; C. Borkel, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 289.

²⁾ W. Scheermesser, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 363, und Bd. XLI, S. 68.

³⁾ M. Siegfried, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIII, S. 2851; Diese Zeitschrift, Bd. XXXV, S. 164, und Bd. XXXVIII, S. 259; Fr. Müller, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 265.

Wieder muß ich betonen, daß die von mir und meinen Mitarbeitern mit Hilfe der Methode der Gefrierpunktserniedrigung gewonnenen Werte aus den früher erörterten Gründen nicht zu der Annahme der betreffenden Molekulargewichte berechtigen können. Es läßt sich zwar heute nicht sagen, warum in diesem Falle nicht die entsprechenden Werte erhalten werden; jedoch muß man mit der Möglichkeit rechnen, daß die Peptone in wässriger Lösung in mehrere Moleküle gespalten sind.

Man könnte erwarten, daß aus der empirischen Zusammensetzung den Äquivalentgewichten und den mit Hilfe der Bestimmung der Leitfähigkeit ermittelten Werten λ_{32} und λ_{1024} nach dem Ostwaldschen Basizitätsgesetz die Molekulargröße berechnet werden könnte. Aber auch dies ist nicht angängig. Das Ostwaldsche Gesetz besagt, daß die Basizität einer einbasischen Säure gleich ist $\frac{\Delta}{10}$, wenn Δ die Differenz der molekularen Leitfähigkeit des Natronsalzes bei der Verdünnung 1024 und der molekularen Leitfähigkeit des Natronsalzes bei der Verdünnung 32 ist. Dieses rein empirische Gesetz ist auch für mehrbasische, bis sechsbasische Säuren bestätigt gefunden, wenn für μ die äquivalenten Leitfähigkeiten λ bestimmt werden. Nur für stark hydrolysierte Natriumsalze ist es nicht anwendbar. Da bei diesen NaOH in der Lösung vorhanden ist, sollte man erwarten, daß die Differenz $\lambda_{1024} - \lambda_{32}$ zu hoch gefunden würde. Aber gerade das Gegenteil ist der Fall. Je größer die Verdünnung ist, um so mehr macht sich der Einfluß der Kohlensäure bemerkbar; dadurch, daß die in den ersten, geringeren Verdünnungen infolge der Hydrolyse vorhandene Natronlauge mehr oder weniger bei den größeren Verdünnungen in Natriumkarbonat übergeführt wird, steigt die Leitfähigkeit in viel geringerem Grade an, als es der Leitfähigkeit des Natriumsalzes + durch Hydrolyse gebildeten NaOH entsprechen würde.

Hierfür gibt es genug Belege in der Literatur. So findet P. Walden¹⁾ für die Basizität des Dinatriumphosphates $\lambda_{1024} - \lambda_{32} = 14,5$ anstatt 20 und gar für Trinatriumphosphat

¹⁾ P. Walden, Zeitschrift f. physikal. Chemie, Bd. I, S. 544.

$\Delta = 16,8$ anstatt 30. Hier nimmt λ von λ_{266} überhaupt nicht merklich zu. Für $\frac{1}{2}(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 + 10 \text{H}_2\text{O})$ findet derselbe Forscher $\Delta = 13,5$ anstatt 20. Herr Dr. A. Kanitz hat im hiesigen Laboratorium die Basizität des Dinatriumsalzes der Protocatechusäure bestimmt und mir das Resultat freundlichst zur Verfügung gestellt. Er findet $\Delta = 14,4$ anstatt 20.

In einer Literaturtabelle von G. Bredig¹⁾ finden sich u. a. die Werte für Δ bei den Natriumsalzen verschiedener Säuren zusammengestellt; so für Dinatriumpyrotartrat 16 und 16,3, für Dinatriumitakonat 16,3, Dinatriummesakonat 16, Dinatriumcitratkonat 17, Dinatriumadipinat 15,2, Dinatriumpimelat 15,0, Dinatriumsuberat 15,0, Dinatriumsebacylat 15,0 anstatt 20.

Auch Herr Neumann hat gefunden, daß Titrationen der Amidosäuren und Peptone mit der Leitfähigkeitsmethode bei größeren Verdünnungen als 64 bzw. 128 wegen der Kohlensäureabsorption nicht angängig sind; deshalb können auch die bei diesen größeren Verdünnungen ermittelten Werte für λ nicht zur Berechnung der Basizität herangezogen werden.

Als Äquivalentgewichte der Peptone berechnen sich aus den Baryumsalzen andere Werte als aus den Leitfähigkeitsbestimmungen. Während man aus den den Peptonen analogen Amidokörpern, der Amidobernsteinsäure und Glutaminsäure, bei gleicher Darstellungsweise wie bei den Peptonen nicht die Baryumsalze $\text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_4\text{Ba}$ und $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_4\text{Ba}$, sondern die Salze $(\text{C}_4\text{H}_6\text{NO}_4)_2\text{Ba}$ und $(\text{C}_5\text{H}_8\text{NO}_4)_2\text{Ba}$ erhält (s. unten), so sind in den Baryumsalzen der Peptone nicht alle Wasserstoffionen ersetzt. Die Äquivalentgewichte, welche durch die Baryumsalze gefunden werden, müssen also größer sein als die durch Titration mit der Leitfähigkeitsmethode erhaltenen und zu diesen in einfachen Verhältnissen stehen. Dies ist tatsächlich der Fall:

Trypsinfibrinpepton α .

| | |
|--|----------------------|
| 1 H ⁺ auf ca. 157 = zuzüglich 10% = | $173 \times 3 = 519$ |
| 1 H-Atom aus Baryumsalz auf | $259 \times 2 = 518$ |

Trypsinfibrinpepton β .

| | |
|---|----------------------|
| 1 H ⁺ auf ca. 197 = abzüglich 8% = | $182 \times 3 = 546$ |
| 1 H-Atom aus Baryumsalz auf | $273 \times 2 = 546$ |

¹⁾ Zeitschrift f. physikal. Chemie, Bd. XIII, S. 222.

Pepsinfibrinpepton α .

1 H⁺ auf ca. 236 = zuzüglich 9% = $257 \times 2 = 514$

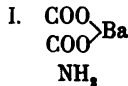
1 H-Atom aus Baryumsalz auf 515 = 515

Pepsinglutinpepton.

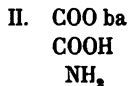
1 H⁺ auf ca. 317 = abzüglich 9% = $287 \times 2 = 574$

1 H-Atom aus Baryumsalz auf 573 = 573

Die Frage nach dem Grade der Genauigkeit der Methode der Äquivalentgewichte der Peptone durch Baryumsalze ist von Herrn Neumann diskutiert worden. Wir müssen berücksichtigen, daß von vornherein die Möglichkeit besteht, daß, wenn wir in die Lösung eines Peptons oder der Asparaginsäure oder Glutaminsäure in Barytwasser, in der wir ein Salz nach dem Typus:



haben, Kohlensäure einleiten, zum Sieden erhitzen und filtrieren, wir nicht nur das Salz:



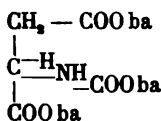
erhalten, sondern auch freie Säure — Pepton oder Asparaginsäure oder Glutaminsäure — und das Salz vom Typus I erhalten. Es fragt sich nun, ob diese Beimengungen so erheblich sind, daß sie die Äquivalentgewichtsbestimmungen mehr beeinflussen, als es die unvermeidlichen Fehlergrenzen gestatten.

Diese Frage war einer experimentellen Prüfung an der Asparaginsäure und Glutaminsäure zugänglich. Die hier gewonnenen Resultate ergaben nun in anfangs mich überraschender Weise, daß ganz glatt die Salze nach dem Typus II entstehen. Leitet man in die Lösung von Asparaginsäure oder Glutaminsäure in Barytwasser Kohlensäure bis zur neutralen Reaktion, kocht auf und filtriert, so enthält das Filtrat lediglich die Salze nach dem Typus II. Dampft man die ganzen Filtrate im Platintiegel ein, trocknet bei 110° bis zum konstanten Gewichte und bestimmt das Baryum, so erhält man gerade so genaue Werte für Ba, als ob die Salze

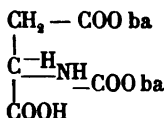


kristallisiert wären.

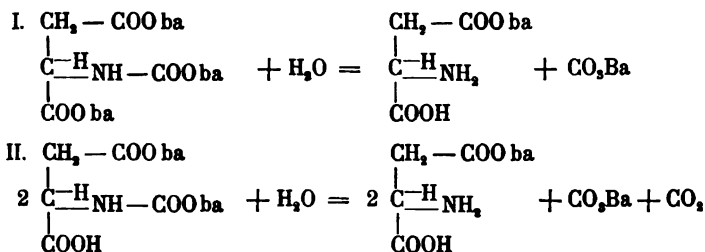
Dieses Resultat dürfte seine Erklärung in der von mir kürzlich¹⁾ mitgeteilten Tatsache finden, daß amphotere Amidokörper bei Gegenwart von Barytwasser Karbaminats bilden, die sich beim Erhitzen unter Abscheidung von Baryumkarbonat zersetzen. So entsteht zunächst aus Amidobernsteinsäure das Salz:



Durch weitere Einwirkung von Kohlensäure entsteht z. T. aus diesem Salze und zwar in Mengen, die einem aus der Stärke der Karbaminosäuren und Kohlensäure resultierenden Gleichgewichte entsprechen, das saure Salz:



Da beide Salze beim Erhitzen ihrer Lösung nach folgenden Gleichungen:



dasselbe saure Baryumsalz geben, wird nur dieses Salz erhalten.

Die Baryumsalze der Peptone waren dargestellt worden, indem die mit kleinem Überschuße von Barytwasser versetzten Peptonlösungen mit Kohlensäure bis zur eben auftretenden neutralen oder schwach sauren Reaktion gesättigt wurden; nach Aufkochen wurde entweder das Filtrat gänzlich im Platintiegel eingedampft, und in dem bis zum konstanten Gewichte getrockneten Rückstande Ba bestimmt; oder es wurde das eingeeengte Filtrat mit Alkohol ausgefällt.

¹⁾ Diese Zeitschrift, dieser Band, S. 85.

Bei den jetzt folgenden Versuchen wurden die für jeden einzelnen Versuch getrennt hergestellten Lösungen der Glutaminsäure und Asparaginsäure mit überschüssigem Barytwasser versetzt, die nach Einleiten von Kohlensäure und Aufkochen dargestellten Filtrate direkt in Platintiegeln eingedampft, erst bei 100° und dann bei 110° getrocknet. In 2 unten bezeichneten Fällen wurde nach Sättigen mit Kohlensäure nicht gekocht, sondern bei Zimmertemperatur anhaltend Luft durchgeleitet:

I. Asparaginsaures Baryum.

I. 0,3701 g Substanz gaben 0,2136 g BaSO₄

II. (Luft durchgeleitet) 0,3045 g Substanz gaben 0,1775 g BaSO₄

| Ba: | Gefunden: | Berechnet: |
|--------|-----------|------------|
| Salz I | 33,97 % | 34,22 % |
| „ II | 34,31 % | . |

II. Glutaminsaures Baryum.

I. 0,4564 g Substanz gaben 0,2479 g BaSO₄

II. 0,3417 „ „ „ 0,1864 „ „

III. 0,3663 „ „ „ 0,1963 „ „

IV. (Luft durchgeleitet) 0,3572 g Substanz gaben 0,1967 g BaSO₄

| Ba: | Gefunden: | Berechnet: |
|--------|-----------|------------|
| Salz I | 31,97 % | 31,98 % |
| „ II | 32,11 % | |
| „ III | 31,54 % | |
| „ IV | 31,41 % | |

Ich bemerke ausdrücklich, daß außer den mitgeteilten Bestimmungen keine anderen ausgeführt wurden, daß also regelmäßig die entsprechenden sauren Barytsalze rein erhalten wurden.

Über den Befund von gepaarter Glukuronsäure in der Galle.

Von

Dr. Manfred Bial, Arzt in Kissingen.

(Aus der speziell-physiologischen Abteilung des physiologischen Instituts in Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 26. Mai 1906.)

Durch eine im Zentralblatt für Physiologie 1904 veröffentlichte Untersuchung habe ich den Übergang von gepaarter Glukuronsäure in die Galle wahrscheinlich gemacht. Es hatte sich nämlich gezeigt, daß nach subkutaner Einverleibung von Menthol die Galle der einige Stunden später getöteten Hunde folgende Erscheinungen aufwies: Die native Galle hatte keinen Geruch, beim Kochen mit einigen Tropfen starker Schwefelsäure entwickelte sich rasch der charakteristische, stechende Mentholgeruch. Die native Galle zeigte keine Reduktionskraft gegenüber Fehlingscher Lösung, wogegen die mit Schwefelsäure gekochte Galle deutliches Reduktionsvermögen erkennen ließ. Die auch den Glukuronsäuren zukommende Orcinreaktion war bei derartigen Gallenflüssigkeiten stets in kräftigem Maße vorhanden. Damit war nachgewiesen, daß in der Galle solcher mit Mentholinjektion behandelter Tiere Menthol in gebundener Form auftritt; andererseits wies das Eintreten der Reduktionskraft nach dem Kochen mit Säure und die starke Orcinreaktion darauf hin, daß es sich um Mentholglukuronsäure bei dieser Mentholverbindung handeln dürfte; eine andere Mentholpaarung im Körper ist ja auch nicht bekannt. Der sichere Nachweis der Glukuronsäure in der Galle erforderte aber die Darstellung eines charakteristischen Derivates. Dieses durfte man nicht erwarten aus den geringen Mengen Galle darstellen zu können, welche sich in der Gallenblase getöteter Hunde vorfinden. Und so erwies es sich als nötig, um größere Mengen Galle zu ge-

winnen, einen Gallenfistelhund zu benutzen. Mit der Galle eines derartigen Tieres, welches mir durch das freundliche Entgegenkommen des Herrn Prof. Schultz zur Verfügung gestellt war, gelang es, das noch fehlende Beweisstück für die Anwesenheit von Menthoglukuronsäure in der Galle nach Mentholinjektion zu erbringen.

Ich verfuhr folgendermaßen:

Dem mittelgroßen Hunde, welcher eine Kanüle in seiner nach Dastrescher Methode (in zwei Zeiten) angelegten Gallenfistel trug, wurden abends um 8 Uhr und morgens um 8 Uhr und 10 Uhr subkutane Einspritzungen von Menthol, gelöst in Olivenöl (15 g zu 70 g), gemacht; und zwar abends 10 g dieser Lösung, morgens um 8 Uhr 5 g, und morgens um 10 Uhr 10 g, so daß das Tier pro Versuch ca. 5 g Menthol beigebracht erhielt. Des öfteren wurde auch die Abendinjektion weggelassen. Von 9 Uhr morgens bis etwa 3 Uhr nachmittags stand der Hund in einem Hängeapparat, wobei die Galle aus der Kanüle abtropfte und in einem zweckmäßig aufgestellten Schälchen bequem aufgefangen wurde. Es wurden an den Versuchstagen auf diese Weise größere oder geringere Mengen Galle, zwischen 15 und über 60 ccm schwankend, gewonnen; das Aussehen der Galle war wechselnd zwischen grünlicher, gelblicher und gelbbrauner Farbe. Die Portionen der einzelnen Versuche wurden vereinigt, bis 280 ccm erhalten waren. Die Konservierung geschah durch sofortiges Versetzen der jeweils gewonnenen Portionen mit dem gleichen Volumen 20%iger Bleizuckerlösung; von der Bleifällung wurde abfiltriert. Nun wurde die gesamte Flüssigkeitsmenge, welche nach dem Nachwaschen des Bleiniederschlages ca. 600 ccm betrug, so lange mit Bleiessig versetzt, bis das Filtrat hiervon mit Bleiessig keine neue Fällung mehr ergab. Die so gewonnene Fällung mußte die Menthoglukuronsäure als Bleisalz enthalten; nach dem genügenden Waschen dieser Fällung mit destilliertem Wasser wurde dieselbe in eine Porzellanschale gebracht und mit 100 ccm 4%iger Schwefelsäure gründlich verrührt, um vom Blei zu befreien, darauf wurde abfiltriert, der Filterrückstand noch mit einigen Kubikzentimetern 4%iger Schwefelsäure nachgespült, und

das so erhaltene Filtrat wurde darauf $1\frac{1}{2}$ Stunden am Rückflußkühler gekocht. Danach zeigte eine Probe der Flüssigkeit nach dem Neutralisieren eine kräftige, vor dem Kochen schon eintretende, einer $\frac{1}{2}\%$ igen Zuckerlösung etwa entsprechende Reduktionskraft gegenüber Fehlingscher Lösung. Außerdem zeigte sich ein höchst intensiver Mentholgeruch. Die Spaltung der Menthoglukuronsäure wurde nun als genügend reichlich erfolgt angenommen. Die ganze Flüssigkeit wurde nach dem Erkalten mit konzentrierter Natronlauge neutralisiert und von den öligen Ausscheidungen abfiltriert. Es resultierte eine hellgelbliche, klare Lösung, dieselbe wurde mit einer Lösung von 0,5 g Bromphenylhydrazin in 2 ccm Eisessig versetzt und auf dem Wasserbade gekocht. Nach $\frac{1}{2}$ Stunde begann die Ausscheidung gelblicher Kristalle. Die völlige Ausscheidung der Verbindung nahm etwa $1\frac{1}{2}$ Stunden Kochzeit in Anspruch, indem die ersten Ausscheidungen auf dem Filter gesammelt, das Filtrat von neuem gekocht, die weiteren dadurch erhaltenen Kristallmengen mit den ersten vereinigt und so weiter verfahren wurde, bis sich nichts mehr ausschied. Der so erhaltene Niederschlag zeigte schon seinem äußeren Verhalten nach die von Neuberg als charakteristisch für die Bromphenylhydrazinverbindung der Glukuronsäure angegebenen Eigenschaften. Er erwies sich als unlöslich in heißem Wasser, in kaltem und auch in heißem Alkohol. (Die Bromosazone des Traubenzuckers sowie der Xylose und Arabinose sind nach Neuberg schon in kaltem Alkohol leicht löslich.)¹⁾ Nach der Behandlung des Präparates auf solche Weise resultierten schön hellgelbe, glänzende Kristalle, welche auf dem Filter getrocknet wurden; die Menge derselben betrug 0,105 g.

Von einer Umkristallisation wurde, um Verluste zu verhüten, Abstand genommen. Die N-Bestimmung nach Dumas ergab aus 0,0849 g

Gefunden:

7,98%

Berechnet:

7,35%

(Die Bromosazone des Traubenzuckers sowie der Xylose und Arabinose enthalten nach Neuberg 10,85%, sowie 11,81% N.)¹⁾

¹⁾ Neuberg, Chemische Berichte, Bd. XXXII, Heft 17, 1899.

Damit ist der Nachweis der Glukuronsäure in der Galle nach jeder Richtung hin befestigt.

Ich teile noch einen zweiten Versuch an demselben Hunde mit, welcher folgendermaßen verlief:

Dem Tier war nach einiger Zeit die Kanüle herausgefallen, und die Galle wurde aus der Gallenblase durch Katheterisieren derselben vermittelt Einführung eines kleinen Metallkatheters in den zur Gallenblase führenden Gang gewonnen. Es wurden dem Tiere die Mentholinjektionen in der oben beschriebenen Weise gemacht und abends um 6 Uhr die Einführung des Metallkatheters in die Gallenblase vorgenommen, darauf entleerten sich größere Mengen goldgelber, klarer Galle, an einem Tage 35 ccm; an dem darauf folgenden Tage 45 ccm. Aus den gesammelten 80 ccm Galle wurde der Bleizucker- und der Bleiessigniederschlag, wie oben beschrieben, hergestellt. Da sich nun schon im oben beschriebenen Versuche ergeben hatte, daß die Bleizuckerfällung ebenfalls gebundenes Menthol enthielt — offenbar wird durch die massige Fällung von gallensaurem Blei auch Mentholglukuronsäure in die Bleizuckerfällung mitgerissen —, so wurde im zweiten Versuch auch die Bleizuckerfällung verarbeitet. Sie wurde nach dem Waschen mit destilliertem Wasser auf dem Filter getrocknet und nach feinem Pulverisieren mit 50 ccm 4%iger Schwefelsäure verrührt, das Ganze darauf 1½ Stunden am Rückflußkühler gekocht. Das Filtrat vom Niederschlag zeigte starken Mentholgeruch und deutliche Reduktion an einer Probe. Darauf wurde die Flüssigkeit wie oben beschrieben weiter behandelt, und es resultierten schließlich 0,02 g Bromphenylhydrazinverbindung, welche sich durch ihre Unlöslichkeit in kaltem und heißem Alkohol als diejenige der Glukuronsäure erwies.

Somit ist der Übergang von Mentholglukuronsäure in die Galle nach subkutaner Mentholdarreichung festgestellt. Es wird also ein Teil der im Stoffwechsel gebildeten Glukuronsäure nach der Bindung an den Paarling durch die Galle in den Darm transportiert, und damit eröffnete sich die neue Frage, welchen Schicksalen dieser Anteil unterliegt. Ich habe hierbei zunächst die Veränderungen untersucht, welche durch das Zusammentreffen der Mentholglukuronsäure mit Darminhalt

möglich waren. Über die Umwandlung gepaarter Glukuronsäure durch Fäulnisprozesse liegt eigentlich bis jetzt nur eine einzige, kurze Mitteilung von Hildebrandt vor, welcher gelegentlich anderer Untersuchungen berichtet, daß eine Zersetzung von einer anderen, gepaarten Glukuronsäure durch eine Fäulnismischung in acht Tagen derart erfolgt sei, daß von dem zugesetzten Quantum nichts wiedergefunden werden konnte. Die Versuche über die vorliegende Frage stellte ich folgendermaßen an:

Versuch 1.

100 ccm einer Mentholglukuronsäurelösung, welche aus Kaninchenharn (nach Mentholinjektion) über das Bleisalz bereitet war, wurde mit 25 ccm einer wässrigen Aufschwemmung frischer, menschlicher Faeces versetzt.

25 ccm dieser Mischung wurden abgenommen und mit pulverisiertem Bleizucker versetzt. Das Filtrat hiervon war nach mehrmaligem Durchpassieren des Filters genügend klar, um polarisiert zu werden, und ergab eine Drehung von $-1,0^{\circ}$.

Der Rest der Gesamtmischung wurde in zwei Hälften geteilt, die eine Hälfte wurde im Erlenmeyerschen Kölbchen sofort durch Aufkochen sterilisiert und in den Brutofen gebracht, die andere Hälfte wurde direkt ohne vorherige Sterilisation dem Versuche im Brutofen unterworfen.

Nach 24stündigem Verweilen daselbst bei 40° zeigte das nichtsterilisierte Kölbchen starken Mentholgeruch, das sterilisierte Kölbchen dagegen nicht. Eine Probe der Flüssigkeit des nichtsterilisierten Kölbchens zeigte nach der Bleizuckerbehandlung keine Drehung mehr und eine minimale Reduktion. Es war also eine Aufspaltung der Mentholglukuronsäure durch Einwirkung des Darminhaltes eingetreten, die freigewordene Glukuronsäure war offenbar, wie die geringe Reduktion ergab, weiter verändert worden.

Versuch 2.

100 ccm abgekochten, mentholglukuronsäurehaltigen Kaninchenharns wurden mit 25 ccm Faecesaufschwemmung ver-

setzt, eine Probe der Flüssigkeit ergab nach Bleizuckerbehandlung eine Polarisation von $-0,5^\circ$. Die Restflüssigkeit wurde wiederum in zwei Hälften geteilt, die eine Hälfte mit Chloroform im Überschuß versetzt und zur Auflösung des Chloroforms geschüttelt, die andere Hälfte wurde in ihrem Zustande belassen. Beide Flüssigkeiten wurden danach 24 Stunden im Brutofen gehalten. Die mit Chloroform versetzte Flüssigkeit zeigte nach Entfernung des Chloroforms mittelst Luftdurchleitung keinen Mentholgeruch, die andere Flüssigkeit zeigte starken Mentholgeruch und nach Bleizuckerbehandlung eine Drehung von $-0,1^\circ$. Die Reduktionskraft der Flüssigkeit war gering.

Versuch 3.

Bei einem gleichermaßen angestellten Versuch fand sich nach vier Stunden deutlicher Mentholgeruch durch Einwirkung von Faeces auf Mentholglukuronsäure; das Menthol wurde noch außerdem durch Ausschüttelung der Flüssigkeit mit Äther verifiziert; in einem weiteren Versuche zeigte sich die Abspaltung des Menthols schon nach $1\frac{1}{2}$ Stunden. Fernere Versuche mit faulendem Blut und faulenden, anderen Flüssigkeiten zeigten, daß auch durch diese eine Aufspaltung der Mentholglukuronsäure erfolgte.

Es ist damit die Möglichkeit und Wahrscheinlichkeit einer Zersetzung der mit der Galle in den Darm transportierten Mentholglukuronsäure erwiesen.

Die vorliegenden Versuche scheinen mir für einige allgemeinere Gesichtspunkte nicht ohne Interesse zu sein; denn sie illustrieren zuerst die Tatsache, daß der Organismus außer dem hauptsächlich von den Untersuchern in Betracht gezogenen Wege der Harnausscheidung noch über andere Wege der Ausscheidung gebietet.

Es möge erinnert werden, daß hier Erfahrungen hinsichtlich anderer Substanzen schon vorliegen, z. B. bezüglich der Harnsäure, für die Weintraud das Vorkommen im Darm nachgewiesen hat. Andererseits geht aus meinen Versuchen hervor, wie ungemein schwierig es ist, aus alleinigen Urinuntersuchungen, wie das ja zumeist zur Aufhellung von Stoffwechselproblemen

geschieht, eine wirkliche quantitative Übersicht über den Verbrauch von Substanzen im Körper zu gewinnen.

Bezüglich der Glukuronsäure würde es ja wohl die landläufige Meinung sein, daß die im Harn erscheinende Quantität dann der ganzen Menge der nicht im Säftestrom zersetzten Substanz entspräche, während doch die vorliegenden Versuche zeigen, daß ein nicht bestimmbarer, aliquoter Anteil durch Beschreiten des Gallendarmweges der Zerstörung durch andere als Stoffwechselprozesse unterliegt. Wenn man also allein aus quantitativen Urinuntersuchungen bindende Rückschlüsse auf die Vorgänge im Säftestrom, also auf die eigentlichen Stoffwechselprozesse ziehen will, so rechnet man, wie mir scheint, nicht mit einer durch die vorliegenden Versuche deutlich demonstrierten Fehlerquelle.

Die chemische Zusammensetzung der Zellmembranen bei verschiedenen Kryptogamen.

Von

Karl Müller in Freiburg i. Br.

(Der Redaktion zugegangen am 1. Juni 1905.)

Lange Zeit glaubte man, die Zellmembranen der Pflanzen beständen aus einem einheitlichen Stoffe, den Payen¹⁾ 1838 Zellulose nannte. Kurz darauf wurde auch im Tierreich, bei den Tunikaten,²⁾ ein mit der Zellulose in allen Punkten übereinstimmender Körper aufgefunden. Durch neuere Untersuchungen³⁾ ist dieses Vorkommen der Zellulose bestätigt worden, das an und für sich recht merkwürdig ist und sich auf eine einzige Tiergruppe beschränkt.

Erst in neuerer Zeit haben die Arbeiten von E. Schulze, Tollens, Winterstein u. a. gezeigt, daß man verschiedene Zellulosen zu unterscheiden hat. Dieser Gedanke war zwar schon von Schleiden ausgesprochen worden, erlangte aber erst später durch die genannten Männer einen sicheren Boden. Nach dem Vorgang von Schulze⁴⁾ trennt man jetzt allgemein die echten Zellulosen, die bei einer Behandlung mit verdünnten Säuren unverändert bleiben, von der Gruppe der Hemizellulosen ab. Hierunter versteht man diejenigen zelluloseähnlichen Kohlehydrate, die schon durch verdünnte, heiße Mineralsäure unter Wasseraufnahme gespalten werden. Für letztere war früher vielfach die Bezeichnung Reservezellulose üblich, die

¹⁾ Payen, Ann. sc. nat. (2), Bd. II, S. 21 (1839).

²⁾ C. Schmidt, J. f. pr. Ch., Bd. XXXVIII, S. 433 (1846).

³⁾ Winterstein, B. B., Bd. XXVI, S. 362 (1893).

⁴⁾ Schulze, Diese Zeitschrift, Bd. XIV, S. 227 (1890); Bd. XVI, S. 387 (1892); Bd. XIX, S. 38 (1894).

aber in vielen Fällen unzutreffend ist und nur zu Mißverständnissen Veranlassung gibt.

Diese beiden Gruppen von Zellulosen sind aber keineswegs einheitlicher Natur. Durch Hydrolyse erhält man aus ihnen Zucker der verschiedensten Art und zwar sowohl Hexosen wie auch Pentosen.

Bei der Hydrolyse der echten Zellulosen erhält man fast stets Dextrose, seltener Mannose. Man kann daher zwischen der gewöhnlichen oder Dextrosezellulose und der viel seltener auftretenden Mannosezellulose unterscheiden. Letztere ist bisher u. a. in der Steinnuß (Reiss)¹⁾ sowie in den Zellwänden einiger Farne und Moose (Winterstein)²⁾ nachgewiesen worden.

Viel mannigfaltiger sind die Hemizellulosen zusammengesetzt. Durch Hydrolyse sind von Pentosen bisher nur Arabinose und Xylose erhalten worden, ferner eine Methylpentose, die Fukose. Von Hexosen findet sich außer Dextrose und Mannose häufig auch Galaktose. Je nach der Art der entstehenden Zucker bezeichnet man die in den Zellwänden enthaltenen Muttersubstanzen derselben im allgemeinen als Pentosane (Methylpentosane) und Hexosane und im einzelnen als Araban, Xylan, Dextran, Mannan, Galaktan usw.

Ebenso wie sich die Zellulose, einer der charakteristischsten Stoffe des Pflanzenreichs, auch bei einer bestimmten Tierklasse, den Tunikaten, wiederfindet, kommt auch umgekehrt bei einer begrenzten Pflanzengruppe, den Pilzen, ein typischer Stoff des Tierreichs, das Chitin, vor.

Der Nachweis des Chitins in pflanzlichen Zellhäuten wurde fast gleichzeitig von Gilson³⁾ und Winterstein⁴⁾ erbracht. Während diese beiden das Chitin bei einigen Pilzen makrochemisch nachgewiesen haben, hat v. Wisselingh⁵⁾ ihre Arbeiten durch mikrochemische Untersuchung einer großen Zahl weiterer Arten ergänzt.

¹⁾ Reiss, B. B., Bd. XXII, S. 609 (1889).

²⁾ Winterstein, Diese Zeitschrift, Bd. XXI, S. 152 (1895).

³⁾ Gilson, B. B., Bd. XXVIII, S. 821 (1895).

⁴⁾ Winterstein, B. B., Bd. XXVII, S. 3113 (1894).

⁵⁾ v. Wisselingh, Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. XXXI, S. 665 (1898).

Außer bei den Pilzen scheint Chitin nur noch bei wenigen niedrigen Algen vorzukommen, z. B. nach Kohl¹⁾ bei den Cyanophyceen.

Neben Chitin und Zellulose kommen fast in allen Zellmembranen auch pektinartige und aromatische Verbindungen vor. Da hierauf sich beziehende Untersuchungen von mir in der vorliegenden Arbeit nicht angestellt wurden, unterlasse ich es, näher darauf einzugehen.

Mit wenigen Ausnahmen beschränken sich die bisherigen Arbeiten über Zellwandbestandteile fast ausschließlich auf höhere Pflanzen, zumal auf solche von irgendwelcher technischen Bedeutung. Von Kryptogamen sind nur die Pilze eingehender untersucht worden, die, infolge der Entdeckung des Chitins bei ihnen, besonderes Interesse boten. Wichtige und vielumstrittene Fragen harren jedoch auch hier noch der Beantwortung, namentlich die Frage nach dem Nährwert der Pilze. Der verhältnismäßig hohe Stickstoffgehalt der Pilze ist hinlänglich bekannt, aber es wäre übereilt, daraus auf großen Nährwert zu schließen, denn der Stickstoff stammt nur teilweise aus dem Eiweiß, der Rest, zuweilen vielleicht die Hauptmenge, gehört dem unverdaulichen Chitin an. Deshalb steht die so weit verbreitete Ansicht über den hohen Nährwert der Pilze auf sehr schwachen Füßen.

Außer über Pilze liegen aus neuerer Zeit eingehende Untersuchungen einiger Meeresalgen, sowie weniger Flechten bezüglich ihrer Zellwandbestandteile vor. Aus den übrigen Gruppen der Kryptogamen ist noch so gut wie gar nichts bekannt. Ich habe im folgenden jeweils bei den einzelnen Gruppen kurz mitgeteilt, was bis jetzt über die Membranstoffe bekannt war, und kann mich deshalb hier mit diesen kurzen Andeutungen begnügen. Welche großen Lücken in diesem weiten und schwierigen Gebiet noch auszufüllen sind, geht am besten aus der eben erscheinenden «Biochemie der Pflanzen» von Czapek²⁾ hervor, worin sich alles, was über den hier behandelten Gegenstand in der sehr zerstreuten Literatur bis jetzt bekannt geworden

¹⁾ Kohl, Über die Organisation etc. der Cyanophyceenzelle, Jena.

²⁾ Czapek, Biochemie der Pflanzen, I. Bd., Jena 1906.

ist, zusammengestellt findet. Einen kleinen Teil dieser Lücken auszufüllen, ist der Zweck dieser Arbeit.

Die Schwierigkeiten der folgenden Untersuchungen lagen einerseits in der langen Dauer, welche die Zubereitung erforderte, um reine, vom plasmatischen Inhalt befreite Zellen zu erhalten, andererseits in den großen Mengen, mit denen man zu arbeiten gezwungen ist, um von den weniger reichlich vorhandenen Membranbestandteilen einigermaßen beträchtliche Ausbeuten zu erhalten.

Die Verarbeitung des Materials geschah in der bei solchen Untersuchungen üblichen und in der Literatur mehrfach erwähnten Weise, wobei je nach den vorhandenen Bestandteilen der gewöhnliche Gang der Zubereitung unter Umständen etwas abgeändert wurde. Auch die Ausführung der Verzuckerung wich von der Methode von Flechsig¹⁾ kaum ab. Die Neutralisation der Säure wurde anfangs mit Baryumkarbonat bewerkstelligt, später aber ausschließlich durch Schlemmkreide, weil die Flüssigkeit bei dieser Art des Arbeitens leicht an der Saugpumpe abgesaugt werden kann, ohne daß sich das Filtrat trübt, wie es bei Anwendung von Baryumkarbonat stets der Fall ist.

Die Erkennung der einzelnen Zucker erfolgte durch Herstellen charakteristischer Verbindungen oder durch Oxydation nach den gebräuchlichen Methoden. Auf die Art und Weise der Ausführung werde ich bei den einzelnen Pflanzen genauer eingehen.

1. Algen.

Die formenreiche Klasse der Algen ist bis jetzt schon von verschiedenen Chemikern zum Gegenstand eingehender Untersuchung gemacht worden, doch beschränkte man sich meist auf Meeresalgen, die leicht in großer Menge zu erhalten sind. Demnach wissen wir über die Zellwandbestandteile der Braunalgen und Rotalgen schon gut Bescheid, wenigstens im Vergleich zu einer anderen großen Gruppe der Algen, zu den Grünalgen.

¹⁾ Flechsig, Diese Zeitschrift, Bd. VII, S. 523 (1883).

Von Braunalgen sind *Fucus* und *Laminaria* am genauesten untersucht. Nach v. Wisselingh¹⁾ enthalten sie Zellulose und Fucin, welch letzteres noch sehr wenig bekannt ist. Ferner wurde eine Methylpentose, die Fukose,²⁾ aufgefunden, isomer mit Rhodeose. Die schleimartigen Stoffe von *Laminaria* liefern bei der Hydrolyse Dextrose.

Die Membranen der Florideen oder Rotalgen sind bisher an mehreren Arten untersucht worden, die im Handel erhältlich sind, wie «Agar-Agar», «Carragheen-Moos» usw. Der Hauptsache nach bestehen die Membranen aus Hemizellulosen, die bei der Hydrolyse³⁾ vorwiegend Galaktose geben, daneben aber auch Dextrose, Mannose, Fruktose, Pentosen und Methylpentosen. Zellulose⁴⁾ kommt in wechselnder Menge ebenfalls vor.

Über die Grünalgen liegen, soweit ich die Literatur übersehen konnte, noch keine makrochemischen Untersuchungen vor. Wie sich aus dem folgenden ergibt, zeigt diese Gruppe gegenüber den schon genannten Gruppen wenig Neues. Die Hemizellulosen treten hier an Menge sehr zurück gegen die echte Zellulose.

Cladophora glomerata (L.).

In großer Menge findet sich diese Alge an den Holzkähnen der Schiffbrücke bei Breisach,⁵⁾ wo sie, allerdings nicht ohne Mühe, in genügender Menge aufgenommen werden konnte. Zur Verarbeitung benutzte ich 440 g Trockensubstanz. Das Material wurde zunächst mehrmals mit Wasser gewaschen, um feinen Kalkschlamm zu entfernen, dann mehrere Tage mit etwa 0,5%iger Salzsäure behandelt und wieder mit Wasser ausgewaschen. Hierauf wurde die Alge abwechselnd mit kalter 0,5%iger Natron-

¹⁾ v. Wisselingh, *Jahrb. f. wiss. Bot.*, Bd. XXXI, S. 635 (1898).

²⁾ Günther und Tollens, *B. B.*, Bd. XXIII, S. 2585 (1890).

³⁾ Vergl. Haedicke, Bauer und Tollens, *Liebigs Annal.*, Bd. CCXXXVIII, S. 302 (1887); Sebor, *Österr. Chem.-Ztg.*, Bd. III, S. 441 (1890); Oshima und Tollens, *B. B.*, Bd. XXXIV, S. 1422 (1901).

⁴⁾ Sestini, *Zentr. Agr. Ch.*, 1878, S. 875.

⁵⁾ Herr Prof. Oltmanns hatte die Güte, mich auf diesen Fundort aufmerksam zu machen.

lauge, mit heißem Wasser und siedendem Alkohol ausgezogen, solange bis sich das Filtrat nicht mehr färbte, was nach 5 Monaten erreicht war.

Ein Teil des so vorbereiteten Materials wurde mit Salzsäure (spez. Gew. 1,15) destilliert. Das Destillat färbte Anilinacetat stark rot, wodurch das Vorhandensein von Pentosen erwiesen war. Ein Teil des Destillates gab nach Versetzen mit konzentrierter Salzsäure und Phloroglucin¹⁾ deutlich das Absorptionsspektrum des Methyلفurols, eine Tatsache, die schon von Votoček²⁾ angegeben ist.

Nach diesen Voruntersuchungen wurde die vorbereitete Alge zwecks Hydrolyse der Hemizellulosen mit 3%iger Schwefelsäure 6 Stunden gekocht und das mit kohlensaurem Kalk neutralisierte Filtrat nach dem Absaugen des Kalkniederschlags im Vacuumapparat eingedampft. Auf diese Weise wurde eine geringe Menge Sirup erhalten, die zwecks Untersuchung auf Arabinose und Xylose geteilt wurde. Ich will gleich bemerken, daß die Probe, die mit Benzylphenylhydrazin versetzt war, leider verunglückte und daß ich deshalb nicht in der Lage bin, über das Vorhandensein von Araban in dieser Alge zu berichten.

Der zweite Teil des Sirups wurde nach der Methode von Bertrand³⁾ auf Xylose untersucht. Ich versetzte einige Tropfen Sirup mit wenig Wasser und wenig Brom und ließ 24 Stunden stehen. Hierauf wurde die Flüssigkeit mit Kadmiumkarbonat gesättigt, das Brom verjagt, die Flüssigkeit eingedampft, mit Wasser aufgenommen, filtriert und mit gleichen Teilen Alkohol versetzt. Nach einigem Stehen schieden sich die charakteristischen kleinen Kriställchen der Bromkadmiumverbindung der Xylose aus, wodurch das Vorhandensein von Xylan als Zellwandbestandteil erwiesen ist.

Die überaus geringe Menge des aus den Hemizellulosen hergestellten Sirups gestattete mir nicht, auf das Vorkommen von Dextrose und Mannose zu prüfen.

¹⁾ Widtsoe und Tollens, B. B., Bd. XXXIII, S. 143 (1900).

²⁾ Votoček, Chem.-Ztg., 1904, Rep. S. 23.

³⁾ Bertrand, Bull. chim. (3. Ser.), Bd. V, S. 554.

Der von den Hemizellulosen befreite Rückstand wurde mit Schulzeschem Reagens (auf 1 Teil Substanz 12 Teile Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1,15 und 0,8 Teile Kaliumchlorat) 14 Tage lang stehen gelassen, dann ausgewaschen. Die nunmehr fast ganz weißen Algenfäden kochte ich mit sehr verdünntem Ammoniak, wusch sie gut aus, preßte sie auf Ton ab und trocknete sie im Dampftrockenschrank. Ich erhielt so 75 g Zellulose, die in ein kaltes Gemisch von 500 g konzentrierter Schwefelsäure und 170 g Wasser eingetragen und darin einige Tage stehen gelassen wurde. Hierauf verdünnte ich auf etwa 3 % freie Säure und kochte 6 Stunden lang. Da es mir bei meinen Versuchen nie gelang, alle Zellulose zu verzuckern, wahrscheinlich deshalb, weil die hergestellte Zellulose doch nicht ganz rein war, habe ich bei dieser Pflanze den unverzuckerbaren Rest abfiltriert, getrocknet, nochmals mit etwa 80%iger Schwefelsäure behandelt und hydrolysiert. Der jetzt noch bleibende Rest betrug 16% der ursprünglichen Zellulose.

Aus dem sauren Filtrat wurde nach der Neutralisation in üblicher Weise ein Sirup hergestellt. Ein Teil desselben gab mit essigsauerm Phenylhydrazin erst beim Erwärmen ein Osazon, das nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Alkohol gegen 205° schmolz, demnach Dextrosephenylosazon darstellte.¹⁾ Wäre Mannose in dem Sirup enthalten gewesen, so hätte sich das Hydrazone schon in der Kälte abscheiden müssen.

Einen anderen Teil des Sirups verwandelte ich durch Oxydation mit Salpetersäure (spez. Gew. 1,15) in Zuckersäure. Davon wurde das Silbersalz in der üblichen Weise hergestellt und analysiert.

0,3900 g zuckersaures Silber hinterließen nach dem Glühen 0,2002 g Silber
= 51,3%. (Berechnet: 50,9%.)

Die Zellulose der *Cladophora* gibt somit bei der Verzuckerung Dextrose, sie ist also eine Dextrosezellulose. Nach den mikrochemischen Befunden ist es wahrscheinlich, daß die übrigen Grünalgen ähnlich zusammengesetzt sind.

¹⁾ Nach Mütter, Tabellen der Schmelzpunkte der Hydrazone und Osazone der Zuckerarten, Göttingen, 1903, liegt der Schmelzpunkt zwischen 204° und 205°.

Zusammenfassung: Hemizellulose: Xylan; Zellulose: Dextrosozellulose.

2. Flechten.

Die ausführlichste Arbeit über die symbiontische Pflanzengruppe der Flechten ist von Escombe¹⁾ ausgeführt. Daneben finden sich in der Literatur noch zahlreiche kleinere Arbeiten über die Zellwandbestandteile der Flechten. Trotzdem stehen unsere Kenntnisse davon noch sehr zurück, da gerade in dieser Gruppe mit der Untersuchung einiger Typen wenig getan ist, weil sich bei den Flechten eine große Mannigfaltigkeit im chemischen Aufbau zeigt. Es ist auch leicht verständlich, daß hier eine noch größere Abwechslung möglich ist, als bei den anderen Gruppen der Kryptogamen, da ja die Flechten die Symbiose eines Pilzes mit einer Alge darstellen. Die Membranen beider Gewächse sind aber nach den bisherigen Untersuchungen schon sehr verschiedenartig in ihrer chemischen Zusammensetzung und das bedingt eine noch größere Mannigfaltigkeit bei den Flechten.

Als Pilze kommen bei den Flechten nur Ascomyceten in Betracht, als Algen nur Grünalgen. Die Verschiedenheit im chemischen Aufbau wird mehr auf Rechnung der ersteren zu setzen sein.

Die Zellwände der Flechten bestehen fast ganz aus Hemizellulosen, während widerstandsfähige Zellulose und Chitin nur in sehr geringer Menge nachweisbar sind.

Von Hemizellulosen beanspruchen die in heißem Wasser löslichen besonderes Interesse. Bis jetzt kennt man von solchen Substanzen das Lichenin, Isolichenin und Evernin. Zur Kenntnis des Lichenins und Evernins habe ich im folgenden Beiträge geliefert.

In verdünnten Säuren lösten sich bei allen untersuchten Flechten reichliche Mengen von Hemizellulosen auf, die sich als Abkömmlinge des Galaktans erwiesen. Zum erstenmal ist ferner der Nachweis geführt worden, daß manche Flechten (nicht alle) Pentosane enthalten, die ja sonst im Pflanzenreich ziemlich ver-

¹⁾ Escombe, Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 288 (1896).

breitet sind. Ob die Pentosane aus den Algenzellen stammen, was nach dem Befunde bei *Cladophora* wahrscheinlich ist, ließ sich nicht entscheiden. Da sie jedoch nicht bei allen Flechten vorkommen, ist es möglich, daß auch die Pilzhypphen pentosanartige Bestandteile in geringer Menge enthalten.

Über Chitin bei Flechten sagt v. Wisselingh:¹⁾ «Was die Anwesenheit von Chitin anbetrifft, so kann man alle denkbaren Fälle unterscheiden; bei *Peltigera* kommt viel Chitin in den Wänden der Hyphen vor; die meisten *Lichenes* enthalten wenig oder sehr wenig Chitin und bei *Cetraria* fehlt besagter Zellstoff ganz». Im allgemeinen stimmt dies mit meinen Untersuchungen völlig überein.

Zellulose findet sich bei den Flechten, wie es scheint, nur in den Membranen der Algenzellen. Escombe²⁾ schloß auf Zellulose infolge der Löslichkeit der Algenzellen in Kupferoxydammoniak. V. Wisselingh³⁾ kam zur gleichen Ansicht, da sich die Algen mit Jodlösung blau färben und gegen Erhitzen mit Glycerin auf 300° widerstandsfähig sind. Nur die Algen bei *Peltigera* bestehen nach v. Wisselingh nicht aus Zellulose, da sie sich mit Jod nicht färben und sich beim Erhitzen mit Glycerin lösen.

Cladonia rangiferina (L.).

Die Renntierflechte, die auf dem Feldberg im Schwarzwald leicht in großen Mengen zu sammeln ist, wählte ich als Objekt für die Membranuntersuchungen bei Flechten. Es war anzunehmen, daß infolge der symbiontischen Lebensweise von Alge und Pilz sowohl Zellulose, aus den Algenzellen stammend, als auch Chitin, von den Pilzhypphen herrührend, aufzufinden sei. Es lagen allerdings über diese Flechte⁴⁾ schon Untersuchungen vor, die aber das Vorkommen von Chitin bestritten. Darum wurden die Angaben nachgeprüft und wie aus dem folgenden

¹⁾ v. Wisselingh, Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. XXXI, S. 667 (1898).

²⁾ Escombe, a. a. O.

³⁾ v. Wisselingh, a. a. O., S. 668.

⁴⁾ Vergl. v. Wisselingh, a. a. O.

hervorgeht, gelang es, Chitin und Zellulose in geringer Menge makrochemisch nachzuweisen.

Ein Teil des sorgfältig gereinigten Materials gab nach der Destillation mit Salzsäure mit Anilinacetat schwache Furoolreaktion. Es wurde deshalb eine quantitative Analyse ausgeführt, indem das aus einer abgewogenen Menge der Flechte erhaltene Furool mit essigsäurem Phenylhydrazin gefällt wurde. Es entstand sehr bald ein Niederschlag, der nach eintägigem Stehen abfiltriert und bei 90° getrocknet wurde.

1,1475 g Substanz gaben 0,0245 g Furoolphenylhydrazon = 0,0173 g entsprechend 1,5% Pentosan.

Bei dem geringen Pentosangehalt wurde eine genauere Identifizierung nicht versucht. Erwähnt sei, daß Nilson¹⁾ in dieser Flechte keine Pentosen nachweisen konnte. Auch ich erhielt nach dreimonatlicher Behandlung des Materials in der unten beschriebenen Weise keine Furoolreaktion mehr. Die in den Zellwänden vorhandenen Pentosane, deren Anwesenheit man nach dem schon Mitgeteilten wohl annehmen muß, sind demnach in verdünnten Alkalien leicht löslich.

Weiterhin wurde eine größere Menge der Flechte mit Wasser 4 Stunden lang auf dem Dampfbad erhitzt und dann abfiltriert, in der Hoffnung, auf diese Weise Lichenin zu erhalten. Auf Zusatz von Alkohol zum Filtrat fiel aber nichts aus. Auch als die etwa 5 Liter Flüssigkeit auf $\frac{1}{2}$ Liter eingedampft waren, konnte nach Zusatz von gleichviel Alkohol keine Fällung erzielt werden, woraus wohl geschlossen werden darf, daß bei dieser Flechte Lichenin fehlt oder nur in sehr geringer Menge vorkommt. Es ist das deswegen von einigem Interesse, weil meistens behauptet wird, daß dieses vor fast 100 Jahren von Berzelius entdeckte Kohlehydrat in den Flechten sehr verbreitet sei.

Nach diesen Voruntersuchungen wurde das von allen fremden Teilen sorgfältig gesäuberte Material getrocknet, gepulvert, gesiebt und 4 Monate lang abwechselnd mit kalter 0,5%iger Natronlauge, mit siedendem Wasser, mit siedendem Alkohol und Äther behandelt. Bis es von Eiweißstoffen befreit

¹⁾ Nilson, C. C., 1893, Bd. II, S. 942.

und deshalb zur Verzuckerung tauglich war, mußte es 2 mal mit Äther, 6 mal mit Alkohol, 19 mal mit Wasser und 21 mal mit Natronlauge ausgezogen werden. Die gereinigte Masse wurde hierauf mit 1%iger Schwefelsäure und später mit 3%iger gekocht, abfiltriert, das Filtrat mit Baryumkarbonat neutralisiert, von dem gebildeten Baryumsulfat abfiltriert und schließlich eingedampft. Der erhaltene Sirup wurde mehrmals mit Alkohol ausgezogen und der Auszug im Exsikkator eingedunstet. Er schmeckte süß und lieferte mit essigsauerm Phenylhydrazin ein bei 180—183° schmelzendes Osazon, war also Galaktosephenylosazon. (Schmelzpunkt der ganz reinen Verbindung 188—191°).¹⁾ Da jedoch der Schmelzpunkt allein nicht genügende Sicherheit bietet, den Zucker als Galaktose anzusprechen, wurde ein weiterer Teil des Sirups mit Salpetersäure (spez. Gew. 1,15) oxydiert und nach der üblichen Weise Schleimsäure dargestellt, die nach dem Trocknen bei 221—222° schmolz. (Schmelzp. 210—225°.) Im Filtrat von der Schleimsäure konnte Zuckersäure nicht nachgewiesen werden. Der Sirup enthielt demnach nur Galaktose.

Zum Nachweis von Chitin und Zellulose erwies es sich als notwendig, eine größere Menge Ausgangsmaterial zu verarbeiten. Es wurden deshalb etwa 10 kg *Cladonia* gesammelt und peinlichst von allen Beimengungen befreit. Um das Volumen der Flechte vor der Kalischmelze möglichst zu vermindern, wurden sie mehrmals mit sehr konzentrierter Kalilauge und heißen verdünnten Säuren behandelt. Darauf wurde das Material in mehreren Anteilen in einem großen Nickeltiegel mit Kali auf 140—170° erhitzt, die Schmelze in Wasser gelöst, die Lösung neutralisiert und der Rückstand abfiltriert und ausgewaschen. Das Gewicht der Flechte hatte sich nun bedeutend verringert. Sie wurde nochmals mit Kali etwa 1 Stunde erwärmt, wobei die Temperatur einigemal bis 180° gesteigert wurde. Die Lösung der Schmelze mußte sehr stark mit Wasser verdünnt und mit Schwefelsäure neutralisiert werden, dann erst konnte der Rückstand von der Flüssigkeit abfiltriert werden. Er wurde mehrere

¹⁾ Mütter, Tabellen usw.

Tage lang mit heißem Wasser behandelt, um das gebildete Kaliumsulfat zu beseitigen. Der nun völlig neutral reagierende Rückstand wurde hierauf mit sehr verdünnter Essigsäure $\frac{1}{2}$ Tag stehen gelassen, dann erwärmt und abfiltriert. Aus dem Filtrat fiel auf Zusatz von reiner Natronlauge Chitosan in weißen Flocken aus. Die erhaltene Menge war überaus gering und im Vergleich zu der angewandten Menge kaum nennenswert. Mit Jodlösung und Schwefelsäure färbte sich das erhaltene Chitosan zuerst weinrot, dann rotviolett.

Der Rückstand der Kalischmelze konnte nach dem Abscheiden des Chitosans nur noch aus Zellulose bestehen. Er war dunkelbraun gefärbt, also noch sehr unrein. Unter dem Mikroskop konnte man neben anorganischen Verunreinigungen hauptsächlich lose Algenzellen erkennen, daneben zeigten sich noch spärlich andere organisierte Teilchen, deren Herkunft nicht festgestellt werden konnte. Pilzhypen waren dagegen keine nachweisbar.

Die unreine Zellulose löste sich nur teilweise im Schweizerischen Reagens (Kupferoxydammoniaklösung). Ich verzichtete auf eine Reinigung durch Lösen und Wiederausfällen und ließ die möglichst ausgewaschene Masse einige Tage in 80%iger Schwefelsäure stehen. Hierauf wurde auf 3% verdünnt und 6 Stunden gekocht. Der Rückstand, der sich nicht verzuckern ließ, wurde nochmals mit 80%iger Schwefelsäure behandelt und dann hydrolysiert, soweit es möglich war. Die in üblicher Weise dargestellte kleine Menge Sirup wurde mit essigsaurem Phenylhydrazin versetzt und stehen gelassen. Nach dem Erwärmen trübte sich die Flüssigkeit und setzte nach einigen Stunden ein Osazon ab, das nach dem Umkristallisieren gegen 200° schmolz. Leider genügte die Menge nicht, um ein ganz reines Osazon darzustellen, doch kann man, glaube ich, trotzdem daraus schließen, daß Dextrosephenylosazon (Schmelzp. 204—205°) vorlag, das aus der Zellulose der Flechtenalge sich gebildet hat.

Zusammenfassung: Hemizellulosen: Pentosane in geringer Menge, Galaktan, kein Lichenin. Zellulose, aus den Algenzellen stammend: Dextrosozellulose. Chitin ist in äußerst geringer Menge nachweisbar.

Cetraria islandica (L.).

Das «isländische Moos» wurde schon von Escombe¹⁾ vor mehreren Jahren auf seine Zellwandbestandteile hin untersucht. Bei dieser Gelegenheit erhielt er als Nebenprodukt reichlich Lichenin. Während schon vor fast 30 Jahren Klason²⁾ gezeigt hat, daß Lichenin bei der Verzuckerung Dextrose gibt und dieser Befund auch von anderer Seite mehrfach bestätigt wurde, glaubt Escombe im Gegensatz hierzu nachgewiesen zu haben, daß der durch Hydrolyse entstehende Zucker Galaktose sei. Dieser Widerspruch veranlaßte mich, das Lichenin abermals zu untersuchen und zwar, um Irrtümer auszuschließen, von der gleichen Pflanze, von der Escombe ausging. Überdies scheint *Cetraria islandica* von allen Flechten am reichlichsten Lichenin zu enthalten.

Eine größere Menge auf dem Feldberg (Schwarzwald) gesammelte *Cetraria* wurde peinlichst von allen fremden Beimengungen, wie Tannennadeln, Moosstengeln usw. befreit, damit diese Verunreinigungen bei der nachfolgenden Untersuchung auf Zellulose nicht zu Irrtümern Veranlassung gäben.

Ein Teil der Flechte wurde mit Salzsäure destilliert und im Destillat mit Anilinacetat Furol nachgewiesen. Somit ist die Anwesenheit von Pentosanen auch bei dieser Flechte nachgewiesen. Die Menge ist jedoch nur gering.

Die Flechte wurde hierauf einige Tage mit 2%iger Kaliumkarbonatlösung stehen gelassen, wobei die Lösung jedesmal erneuert wurde, sobald sie sich braun gefärbt hatte. In einer großen Schale wurden hierauf die gut ausgewaschenen Pflanzen mit heißem Wasser übergossen und das Wasser etwa 2 Stunden auf einer Temperatur von 80—90° gehalten. Dann wurde sofort durch ein Koliertuch in eine mit Alkohol halbgefüllte Schale filtriert. Hierbei fiel das Lichenin als eine schneeweiße, gallertige Masse aus, die nach einigem Stehen abfiltriert und getrocknet wurde. Mit Jodlösung färbte es sich schwach gelblich. Das

¹⁾ Escombe, a. a. O.

²⁾ Klason, B. B., Bd. XIX, S. 2541 (1886).

viel leichter lösliche Isolichenin färbt sich nach Errera¹⁾ dagegen blau. Von v. Wisselingh²⁾ ist dies verwechselt worden.

Das getrocknete Lichenin wurde mit 3%iger Schwefelsäure hydrolysiert und daraus in bekannter Weise ein Sirup gewonnen, der nach öfterem Umkristallisieren aus Alkohol mit Salpetersäure nach der schon erwähnten Weise oxydiert wurde. Nach dem Abdampfen der Salpetersäure schied sich beim Zerreiben mit Wasser ein weißes Pulver aus, das jedoch anorganischer Natur war. Dieses Pulver hat vielleicht auch Escombe vorgelegen und ihn veranlaßt, darin Schleimsäure zu erblicken. Von letzterer war keine Spur nachzuweisen. Das Silbersalz der erhaltenen Zuckersäure wurde analysiert.

Angew. Substanz: 0,1400 g. Gef. Silber: 0,0720 g
= 51,4% Ag. (Berechnet: 50,9%.)

Da ich nur wenig zuckersaures Silber erhalten hatte, das nur zu einer Analyse ausreichte, wurde eine weitere Menge Lichenin auf die gleiche Weise dargestellt und nach dem Trocknen ohne vorherige Verzuckerung sofort mit Salpetersäure oxydiert. Auch diesmal konnte nicht eine Spur von Schleimsäure aufgefunden werden, dagegen reichlich Zuckersäure. Die Analysen des Silbersalzes ergaben:

| I. | | II. | |
|-------------------------|------------|-------------------------|-----------|
| Angew. Subst.: 0,2884 g | } = 51,25% | Angew. Subst.: 0,4825 g | } = 50,8% |
| Gef. Silber: 0,1474 „ | | Gef. Silber: 0,2451 „ | |
| (Berechnet: 50,9%.) | | | |

Hierdurch scheint die Unhaltbarkeit der Escombeschen Angabe zur Genüge dargetan zu sein.

Der vom Lichenin fast befreite Rückstand der Flechte wurde ein halbes Jahr lang mit 0,5%iger Natronlauge behandelt, wobei die Flüssigkeit durch neue ersetzt wurde, sobald sie sich braun gefärbt hatte. Hierauf wurde die Flechte mit etwa 5%iger Schwefelsäure 6 Stunden gekocht und abfiltriert. Das Filtrat wurde auf 2% freie Säure verdünnt, nochmals 4 Stunden erhitzt, dann mit Schlemmkreide neutralisiert und das Filtrat im Vacuumapparat eingedampft. Mit einem Teil

¹⁾ Errera, Dissert. Brüssel, 1882, S. 18.

²⁾ v. Wisselingh, Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. XXXI, S. 655 (1898).

des erhaltenen, mit Alkohol gereinigten Sirups wurde ein Osazon dargestellt, das nach dem Umkristallisieren bei 192° schmolz. Demnach lag Galaktoseosazon vor (Schmelzpunkt $188-191^{\circ}$). Dies wurde auch durch die Oxydation eines zweiten Teiles des Sirups mit Salpetersäure bestätigt, wobei ich Schleimsäure erhielt, die bei 216° schmolz. Zuckersäure konnte hingegen nicht aufgefunden werden. Hieraus ergibt sich, in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Escombe und anderen, daß die Pilzhyphe n größtenteils aus einem Galaktan bestehen.

Chitin war bis jetzt bei dieser Flechte mikrochemisch nicht nachgewiesen worden und ich versuchte deshalb, ob ich den Nachweis nicht makrochemisch erbringen könnte, zumal mir dies bei *Cladonia* gelungen war. Zu diesem Zweck wurde die nach dem Auskochen mit verdünnter Schwefelsäure zurückgebliebene Masse in der bei *Cladonia* beschriebenen Weise mit Ätzkali bei 180° geschmolzen. Den gut ausgewaschenen, unlöslichen Rückstand behandelte ich einige Zeit mit stark verdünnter Essigsäure. Das stark alkalisch gemachte Filtrat blieb auch nach längerem Stehen ganz klar, wodurch die Abwesenheit von Chitosan und damit auch von Chitin in der ursprünglichen Substanz erwiesen ist. Im Vergleich zu *Cladonia* wurde allerdings auch bedeutend weniger Material verarbeitet. Escombe, der als erster makrochemisch Chitin nachzuweisen versuchte, hatte ebenfalls keinen Erfolg.

Der in Essigsäure unlösliche, grün gefärbte Rückstand, der nur noch Zellulose enthalten konnte, wurde mit Hoffmeisterschem Reagens (1 Teil Substanz, 6 Teile Salzsäure, spez. Gew. 1,05, und soviel Kaliumchlorat, als sich darin löst) 2 Tage behandelt, dann gut ausgewaschen. Er bestand hauptsächlich aus Algenzellen, die sich mit Jodlösung und Schwefelsäure blau färbten. Hierauf wurde die Masse mit sehr verdünntem Ammoniak gekocht, gut ausgewaschen, getrocknet und in der mehrfach erwähnten Weise verzuckert. Die erhaltene Menge Sirup war sehr gering, doch genügte sie zur Darstellung eines Osazons, das nach zweimaligem Umkristallisieren aus Alkohol bei 203° schmolz. Demnach bestehen auch hier, wie bei *Cladonia*, die Algenzellen aus einer Dextrosozellulose.

Zusammenfassung: Hemizellulosen sind verschiedene nachweisbar: Pentosan, Dextran, Galaktan. Die beiden letzteren machen die Hauptmenge des Flechtenthallus aus. Chitin fehlt. Zellulose, aus den Algenzellen stammend, gibt bei der Hydrolyse Dextrose.

Evernia prunastri (L.).¹⁾

Im Jahre 1864 hat Stüde²⁾ einen Membranbestandteil aus *Evernia prunastri* beschrieben, den er Everniin nannte. Dieses Everniin ist nach dem Entdecker in heißem Wasser und verdünnten Laugen löslich, wird durch Alkohol aus der Lösung gefällt, gibt bei der Hydrolyse Dextrose und mit Jodlösung färbt es sich nicht blau. Diese Eigenschaften kommen alle auch dem Lichenin zu (Isolichenin färbt sich mit Jod blau) und Czapek³⁾ vermutete deshalb, daß beide Substanzen miteinander identisch seien. Nach gut miteinander übereinstimmenden Analysen von Stüde hat Everniin jedoch die Formel $C_6H_{15}O_7$, weicht also vom Lichenin bedeutend ab. Meine Absicht war es nun, aufzuklären, ob wirklich zwei verschiedene Substanzen vorlägen. Zu diesem Zweck suchte ich die Oxydationsprodukte des Everniins zu fassen und prüfte nochmals die Formel des Everniins durch mehrere Analysen. Beides war mit erheblichen Schwierigkeiten verknüpft.

Das verwendete Material stammte von den Pappeln an der Straße zwischen Donaueschingen und Dürrhein.

300 g an der Luft getrocknete *Evernia* wurde mit Wasser eine Stunde gekocht, abfiltriert, noch zweimal gekocht und abfiltriert. Die Filtrate wurden zu gleichen Teilen mit Alkohol versetzt, worauf sich fast weiße Flocken ausschieden, die nach eintägigem Stehen von der Flüssigkeit getrennt wurden. Mit Jodtinktur und Schwefelsäure färbte sich die gallertige Masse schwach gelblich. Das Volumen der Flechte hatte nach dieser Behandlung sehr abgenommen.

¹⁾ Herr Dr. E. Baur in Berlin hatte die Freundlichkeit, meine Bestimmung nachzuprüfen.

²⁾ Stüde, Liebig's Ann., Bd. CXXXI, S. 241.

³⁾ Czapek, Biochemie, Bd. I, S. 515.

Ein Teil der grauweißen Masse, die das Everniin darstellte, wurde mit Salpetersäure (spez. Gew. 1,15) oxydiert. Dreimal versuchte ich vergeblich, Zuckersäure zu erhalten, ohne daß ich den Grund des Mißlingens angeben kann. Erst beim vierten Versuch hatte ich Erfolg. Beim Verreiben des Oxydationsproduktes mit Wasser schied sich ein feiner weißer Niederschlag aus, den ich anfangs für Schleimsäure hielt, er war aber anorganischer Natur. Schleimsäure war dagegen keine nachweisbar, woraus auf die Abwesenheit von Galaktan im Everniin geschlossen werden muß. Das erhaltene saure, zuckersaure Kalium wurde zweimal aus Wasser umkristallisiert, dann das Silbersalz dargestellt und analysiert:

$$\left. \begin{array}{l} \text{Angew. Substanz: } 0,1896 \text{ g} \\ \text{Gef. Silber: } 0,0968 \text{ g} \end{array} \right\} = 51,05\% \text{ (Berechnet: } 50,9\% \text{)}$$

Das erhaltene Oxydationsprodukt stimmt mit Stüdes Angaben insofern überein, als er bei der Verzuckerung Dextrose erhalten hat. Diese gibt aber bekanntlich bei der Oxydation Zuckersäure.

Der zweite Teil meiner Aufgabe war die Prüfung der Formel $C_6H_{15}O_7$, denn durch das Oxydationsprodukt war ein Unterschied zwischen Lichenin und Everniin, wie eben gezeigt, nicht aufzufinden gewesen.

Ein Teil des Everniins wurde nach zweimaligem Lösen in kochendem Wasser und darauffolgendem Fällen mit Alkohol im Dampftrockenschrank getrocknet, dann gepulvert und analysiert:

$$\left. \begin{array}{l} \text{Angew. Substanz: } 0,1628 \text{ g} \\ \text{Gefundene Kohlensäure: } 0,2209 \text{ g} \\ \text{Gefundenes Wasser: } 0,1120 \text{ g} \end{array} \right\} = \begin{array}{l} 36,97\% \text{ C} \\ 100 \frac{7,64\% \text{ H}}{55,39\% \text{ O}} \end{array}$$

Hieraus ergibt sich die Formel $C_6H_{15}O_7$, wie sie auch aus den Analysen von Stüde sich ableitet. Was mich aber überraschte, war ein erheblicher anorganischer Rückstand im Schiffchen nach der Verbrennung. Dieser Rückstand betrug 0,0180 g, also 11% des Everniins. Auffallend war ferner, daß meine Analyse mit der von Stüde stimmte, wenn man den anorganischen Rest vernachlässigte. Tut man das aber nicht, dann erhält man folgende Zahlen:

| | | | | |
|------------------------|----------|-----|---------------------------------|----------|
| Angew. Substanz: | 0,1448 g | } = | $\frac{100}{49,65\% \text{ O}}$ | 41,61% C |
| Gefundene Kohlensäure: | 0,2209 g | | | 8,74% H |
| Gefundenes Wasser: | 0,1120 g | | | 49,65% O |

Hieraus berechnet sich die summarische Formel $\text{C}_7\text{H}_{17}\text{O}_6$.

Ein im ganzen viermal gefällttes Everniin ergab bei der Analyse folgende Resultate.

I. Angewandte Substanz = 0,2572 g; hiervon waren 0,0064 g unverbrennliche Bestandteile abzuziehen = 2,89%, also:

| | | | | |
|------------------------|----------|-----|---------------------------------|----------|
| Angew. Substanz: | 0,2508 g | } = | $\frac{100}{50,25\% \text{ O}}$ | 42,47% C |
| Gefundene Kohlensäure: | 0,3906 g | | | 7,28% H |
| Gefundenes Wasser: | 0,1645 g | | | 50,25% O |

II. Angewandte Substanz = 0,1500 g; hiervon waren 0,0046 g unverbrennliche Bestandteile abzuziehen = 3,1%, also:

| | | | | |
|--|----------|-----|---------------------------------|----------|
| Ber. für $\text{C}_7\text{H}_{16}\text{O}_6$: | | | | |
| Angew. Substanz: | 0,1454 g | } = | $\frac{100}{49,67\% \text{ O}}$ | 42,70% C |
| Gefundene Kohlensäure: | 0,2277 g | | | 7,63% H |
| Gefundenes Wasser: | 0,0999 g | | | 49,67% O |

Aus diesen Analysen ersieht man, daß ein großer Teil der anorganischen Substanz nach öfterem Lösen und Füllen verschwunden ist und demnach wohl kaum in Verbindung mit dem Kohlehydrat steht. Ferner stimmen die Resultate der Analysen, nach Abzug des anorganischen Restes, innerhalb der Fehlergrenzen miteinander überein. Die Formel $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{O}_6$ läßt sich aus beiden Analysen berechnen.

Um ganz sicher zu sein, analysierte ich jedoch noch einmal frisch gefällttes, bei 110° getrocknetes Everniin. Es war zu erwarten, daß hier der anorganische Rest noch etwas höher als 11% sei und daß die Prozentzahlen, bei Vernachlässigung des anorganischen Restes, wieder denen von Stüde nahekämen.

| | | | | |
|------------------------|----------|-----|---------------------------------|----------|
| Angew. Substanz: | 0,2004 g | } = | $\frac{100}{56,68\% \text{ O}}$ | 36,74% C |
| Gefundene Kohlensäure: | 0,2700 g | | | 6,58% H |
| Gefundenes Wasser: | 0,1188 g | | | 56,68% O |

Daraus berechnet sich die Formel $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{O}_7$. Der geringere H-Gehalt liegt fast noch in der Fehlergrenze der Analyse.

Der unverbrennliche Rest betrug 0,0280 g, also 14% des Everniins. Zieht man diesen Rest ab, dann erhält man die folgenden Zahlen:

| | | | |
|------------------------|----------|-----|----------|
| Angew. Substanz: | 0,1724 g | } = | 42,81% C |
| Gefundene Kohlensäure: | 0,2700 | | 7,54% H |
| Gefundenes Wasser: | 0,1188 | | 49,65% O |

Hieraus ergibt sich die Formel: $C_7H_{15}O_6$.

Man sieht also, daß dem Everniin die Stüdesche Formel nicht zukommen kann, sondern daß es die summarische Zusammensetzung $C_7H_{15}O_6$ haben muß. Stüde hat den unverbrennlichen Rest wohl deshalb übersehen, weil man zu seiner Zeit die Substanz nicht für sich im Schiffchen verbrannte, sondern mit Kupferpulver gemengt, wobei ein etwa bleibender Rückstand natürlich leicht übersehen werden konnte.

Everniin unterscheidet sich also vom Lichenin in der Zusammensetzung. Auch ist es im Gegensatz zum Lichenin sehr klebrig, sodaß z. B. die Filter beim Trocknen fest zusammenklebten. Bei der Oxydation und Verzuckerung erhält man dagegen die gleichen Produkte wie beim Lichenin.

Der unverbrennliche Bestandteil enthält Kalium und Calcium in ansehnlicher Menge, zwei Elemente, die bekanntlich in allen Pflanzen vorkommen. Ferner sind darin ziemlich viel Quarzkörnchen enthalten, die mechanisch an der Pflanze haften und beim Kolieren der Lösung mit durchgehen und sich auch durch Füllen der Lösung mit Alkohol nur schwer beseitigen lassen.

Der Rückstand der Flechte, der nach dem Auskochen mit Wasser hinterblieb, wurde mit 0,5%iger Natronlauge einige Wochen behandelt. Sobald sich die Lauge braun gefärbt hatte, wurde sie durch neue ersetzt. Hierauf wurde die gut ausgewaschene Flechte mit 3%iger Schwefelsäure 10 Stunden erhitzt und dann abfiltriert. Aus dem Filtrat ließ sich ein Sirup gewinnen, dessen Phenylsazon nach dem Umkristallisieren bei 182° schmolz. Der Rest des Sirups wurde mit Salpetersäure (spezifisches Gewicht 1,15) oxydiert, wodurch Schleimsäure erhalten wurde, die nach dem Trocknen im Dampftrockenschrank den Schmelzpunkt 217° hatte. Zuckersäure ließ sich im Filtrat von der Schleimsäure nicht nachweisen.

Die in verdünnten Säuren lösliche Hemizellulose ist demnach, wie bei den beiden vorigen Arten, ein Galaktan.

Der Rückstand, der nach der Abscheidung des genannten Galaktans blieb, wurde im Nickeltiegel mit Ätzkali auf 160° erhitzt, hierauf die Schmelze in Wasser gebracht und nahezu neutralisiert. Der Niederschlag wurde durch Abgießen von der Flüssigkeit getrennt, dann an der Saugpumpe abfiltriert und gut mit Wasser, zuletzt mit Alkohol und Äther ausgewaschen. Dann ließ ich die Masse einige Stunden in verdünnter Essigsäure stehen, erwärmte gelinde und filtrierte. Das Filtrat wurde mit Ätzkali alkalisch gemacht, worauf sich reichlich weiße Flocken von Chitosan ausschieden, die abfiltriert und mehrmals gelöst und wieder gefällt wurden. Das gut ausgewaschene Chitosan wurde schließlich getrocknet. Mit Jodlösung und verdünnter Schwefelsäure färbte es sich violettrot, so wie es v. Wisselingh¹⁾ für Chitosan angibt. Nach dem Trocknen war die erhaltene Menge so gering, daß eine Analyse nicht ausführbar war, zumal die Substanz noch anorganische Bestandteile enthielt.

Die zuletzt noch übriggebliebene Zellulose wurde zuerst mit Hoffmeisterschem Reagens, dann mit ganz verdünnter Natronlauge behandelt. Trotzdem sie noch ziemlich unrein war, führte ich doch die Jodreaktion auf Zellulose aus. Die Masse färbte sich hierbei nicht rein blau, sondern mehr violett, wohl der Unreinheit wegen. Es scheint ebenfalls, wie bei den früher untersuchten Algen aus Flechten, eine Dextrosozellulose vorzuliegen, die jedoch der geringen Menge wegen nicht verzuckert wurde.

Zusammenfassung: Hemizellulosen bilden weitaus den größten Teil der Flechte. Everniin, in heißem Wasser löslich, Galaktan, in verdünnter heißer Säure löslich, wurden nachgewiesen. Pentosane fehlen. Dem Everniin kann die bisher angenommene Formel nicht zukommen. Chitin ist in geringer Menge vorhanden. Die Algenzellen bestehen aus gewöhnlicher (Dextroso-) Zellulose.

Ramalina fraxinea (L.).

Zusammen mit *Evernia* findet sich auch *Ramalina fraxinea* in Menge an Pappeln bei Donaueschingen. Sie steht

¹⁾ v. Wisselingh, a. a. O., S. 639.

der Evernia sehr nahe und deshalb vermutete ich, daß sie ebenfalls Everniin enthielte. Hauptsächlich um die Richtigkeit dieser Vermutung zu prüfen, wurde die Flechte zum Schluß noch untersucht. Die anderen Bestandteile wurden dagegen nicht weiter berücksichtigt.

Das Vorhandensein von Furol nach der Destillation mit Salzsäure ließ sich bei Ramalina ebensowenig wie bei Evernia nachweisen.

Durch Auskochen mit Wasser und Versetzen des Filtrats mit der gleichen Menge Alkohol erhält man reichlich eine weiße Hemizellulose, die sich, mit Jod bestreut, kaum gelblich färbte. Nach Zusatz von ziemlich konzentrierter Schwefelsäure nahm sie eine blaugrüne Farbe an. Eine Lassaignesche Stickstoffprobe fiel negativ aus.

Ein Teil der erhaltenen Substanz wurde bei 110° getrocknet und analysiert:

I. 0,2809 g hinterließen 0,0034 g Asche = 1,5%

| | | | |
|---|----------|-------------------------------------|----------|
| Angew. Substanz: | 0,2775 g | } = $\frac{100}{48,59\% \text{ O}}$ | 44,02% C |
| Gefundene Kohlensäure: | 0,4480 | | 7,39% H |
| Gefundenes Wasser: | 0,1848 | | |
| = C ₆ H ₁₂ O ₅ . | | | |

II. 0,2834 g angewandte Substanz hinterließen 0,0028 g Asche = 1%

| | | | |
|---|----------|-------------------------------------|----------|
| Angew. Substanz: | 0,2806 g | } = $\frac{100}{48,71\% \text{ O}}$ | 44,11% C |
| Gefundene Kohlensäure: | 0,4538 | | 7,18% H |
| Gefundenes Wasser: | 0,1815 | | |
| = C ₆ H ₁₂ O ₅ | | | |

Berechnet für $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_5$:

43,9% C
7,3% H
48,8% O

Berechnet für $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$:

44,4% C
6,2% H
49,4% O

Aus diesen beiden gut miteinander übereinstimmenden Analysen ergibt sich erstens, daß der Gehalt an anorganischen Bestandteilen, ähnlich wie beim Lichemin, ein sehr geringer ist, im Gegensatz zum Everniin, bei dem ich etwa 10 mal soviel anorganische Salze nachweisen konnte.

Die Analysenzahlen stimmen auf die Formel $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_5$. Ob der verhältnismäßig geringe Mehrgehalt an Wasserstoff gegenüber der Formel $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$ nicht vielleicht doch auf hygro-

skopisches Wasser zurückzuführen ist, konnte ich aus Mangel an Material noch nicht entscheiden. Wenn dies der Fall wäre, so würde das in heißem Wasser lösliche Kohlehydrat aus *Ramalina* mit Lichenin isomer, wenn nicht sogar identisch sein.

Wie bei *Evernia* oxydierte ich auch bei dieser Flechte die erhaltene Hemizellulose. Hierzu wurden 20 g im Dampftrockenschrank getrocknete Substanz mit 80 ccm Salpetersäure (spez. Gew. 1,15) eingedampft, mit Wasser aufgenommen und nochmals auf etwa 40 ccm eingedampft. Die Flüssigkeit blieb darauf 1 Tag stehen, dann wurde abfiltriert. Der schwarze Rückstand war sehr gering; Schleimsäure enthielt er keine. Galaktan ist demnach in dieser Hemizellulose nicht vorhanden. Das Filtrat wurde in der Wärme mit Kaliumkarbonat schwach alkalisch gemacht und dann eingedampft. Beim Zusatz von Eisessig ergab sich ein reichlicher, hellbrauner Rückstand, der auf Ton abgepreßt und aus Wasser zweimal umkristallisiert wurde, was ohne Schwierigkeiten möglich war. Ich erhielt so schneeweiße Kristalle, die in Wasser gelöst wurden. Die Lösung wurde mit Ammoniak neutralisiert, dann Silbernitratlösung zugesetzt, wodurch ein dicker, käsiger Niederschlag gefällt wurde, der nach einiger Zeit körnig wurde und zusammenfiel.

Das erhaltene Silbersalz wurde im Exsikkator getrocknet. Die Analyse ergab, daß zuckersaures Silber vorlag.

| | | | |
|----------------------|----------|-------------|---------------------|
| I. Angew. Substanz: | 0,2398 g | } = 50,8%. | (Berechnet: 50,9%.) |
| Gefund. Silber: | 0,1218 " | | |
| II. Angew. Substanz: | 0,2671 " | } = 50,65%. | |
| Gefund. Silber: | 0,1353 " | | |

Zusammenfassung: Der in heißem Wasser lösliche Bestandteil der *Ramalina* ist den Verbrennungsanalysen nach von dem der *Evernia* wohl verschieden und möglicherweise nichts anderes als Lichenin. Weitere Untersuchungen hierüber sind in Aussicht genommen.

3. Lebermoose.

Soweit mir bekannt ist, sind bis jetzt noch niemals die Zellwände der Lebermoose auf ihre Zusammensetzung hin genauer untersucht worden, wie überhaupt unsere Kenntnisse der Lebermoose in chemischer Beziehung noch sehr zu wünschen

übrig lassen. Eine kurze Notiz gibt Gjokic,¹⁾ der durch mikrochemische Reaktionen feststellt, daß bei Leber- und Laubmoosen die Zellwände aus Zellulose und Pektinstoffen bestehen. Später beschrieb Czapek²⁾ bei Laubmoosen einen aromatischen Zellwandbestandteil, das Sphagnol, das auch in Lebermoosen von ihm nachgewiesen wurde.

Es war von vornherein wahrscheinlich, daß in der Zusammensetzung der Zellwände verschiedene Arten keine großen Unterschiede zeigten, was auch durch die nachstehenden Untersuchungen bestätigt wurde. Die Membranbestandteile beider untersuchten Arten sind genau die gleichen. Mit Jodlösung und Schwefelsäure färben sich die Wände dunkelblau, mit Ausnahme der Mittellamellen. Nach einigen Autoren soll die Blaufärbung nicht immer gleich eintreten. Bei *Trichocolea* z. B. konnte ich keine reine blaue Farbe erhalten, sondern eine grünblaue. Vielleicht rührt das von Czapeks Sphagnol her. Aus Materialmangel konnte ich keine makrochemische Analyse der bei dieser Art vorhandenen Zellwandstoffe ausführen.

Die wahre Zellulose besteht, wie es scheint, bei den Lebermoosen nur aus Dextrosozellulose, im Gegensatz zu den Laubmoosen, wo Winterstein,³⁾ wenigstens bei einer Art, auch Mannose nachgewiesen hat.

Interessant ist der relativ große Gehalt der untersuchten Pflanzen an Pentosanen. Beim Sammeln des Materials wurden Pflanzen mit stark verdickten Zellecken ausgewählt, da ich in den Verdickungen Hemizellulosen vermutete. Die Erwartung erwies sich z. T. als richtig, denn Pentosane konnten reichlich nachgewiesen werden, aber sie sind in den Zellverdickungen offenbar zusammen mit der echten Zellulose vorhanden, da die Verdickungen nach dem Kochen mit verdünnter Schwefelsäure nicht kleiner geworden waren. Bei der Identifizierung der Pentosen wurde nur auf Arabinose und Xylose Rücksicht genommen, doch ist es nicht ausgeschlossen, daß vielleicht noch andere Pentosen in den Lebermoosen vorkommen.

¹⁾ Gjokic, Österr. bot. Zeitschr., 1895, S. 330—334.

²⁾ Czapek, «Flora», 1899, S. 361.

³⁾ Winterstein, Diese Zeitschrift, Bd. XXI, S. 152 (1895).

Spektroskopisch ließen sich Methylpentosen nachweisen. Auch hier ist es nicht unmöglich, daß eine neue Methylpentose vorliegt. Die Untersuchungen, welche sich zur Aufgabe stellen, die Methylpentose genau zu charakterisieren, sind überaus schwierig, weil der Gehalt der Moose daran offenbar sehr gering ist. Ich muß mich deshalb mit dem Hinweis auf ihr Vorkommen begnügen.

Ligninsubstanzen fehlen den Lebermoosen, wenigstens fielen meine diesbezüglichen Reaktionen mit Phloroglucin und Salzsäure alle negativ aus. Zu dem gleichen Ergebnis kam auch Gjokic.

Die nachfolgenden eingehenden Schilderungen der Membranstoffe beziehen sich auf zwei nicht gar zu weit auseinander stehende Gattungen aus der Reihe der akrogynen Jungermannien. Es muß weiteren Untersuchungen anheimgestellt bleiben, wie sich die Marchantiaceen und Anthocerotaceen aufbauen, die ja auch entwicklungsgeschichtlich von den hier behandelten Arten abweichen.

Leioscyphus (Jungermannia) Taylori (Hook).

An einer Felswand am Feldberg (Schwarzwald) konnte ich in hinreichender Menge *Leioscyphus Taylori* sammeln. Dieses Lebermoos wurde deshalb ausgewählt, weil es ein sehr typisch collenchymatisches Zellnetz besitzt. Die Polster zeichneten sich durch große Reinheit aus und konnten fast alle ohne weiteres zur Untersuchung verwendet werden. Das Material wurde im Dampftrockenschrank getrocknet, dann pulverisiert und durch Dampfdestillation ein darin vorhandenes ätherisches Öl gewonnen. Nach der Destillation wurde das Moos während mehrerer Monate mit 0,5%iger Natronlauge behandelt, bis sich diese nicht mehr färbte.

Ein Teil des Moores wurde mit verdünnter Salzsäure destilliert und mit Anilinetat reichlich Furol nachgewiesen. In einer anderen Probe wurde das erhaltene Furol quantitativ bestimmt, indem ich es nach der Vorschrift von Tollens¹⁾ mit Phenylhydrazin fällte. Fast augenblicklich trat eine

¹⁾ Tollens, Handb. d. Kohlehydrate, Bd. II, S. 75.

milchige Trübung ein, und nach kurzer Zeit entstand ein kristallinischer Niederschlag von Furophenylhydrazon, der nach eintägigem Stehen in ein Asbeströhrchen abfiltriert und im Dampftrockenschrank getrocknet wurde.

I. 0,6032 g Moos gaben 0,0747 g Furophenylhydrazon
= 0,0535 g oder 8,7% Pentosan.

II. 0,3170 g Moos gaben 0,0386 g Furophenylhydrazon
= 0,0274 g oder 8,6% Pentosan.

Auf die, wie wir gleich sehen werden, ebenfalls vorhandenen Methylpentosen ist bei dieser Fällungsmethode keine Rücksicht genommen worden.

Zum Nachweis von Methylpentosen wurden 100 g gepulvertes Material mit Salzsäure (1,06 sp. Gew.) destilliert, ein Teil des Destillates nach der Angabe von Widtsoe und Tollens¹⁾ mit dem gleichen Volumen konzentrierter Salzsäure versetzt, erhitzt und vor den Spektralapparat gebracht. Es zeigte sich bald eine Absorption des brechbareren Endes des Spektrums bis zum Grün, wie dies für Methylfurool charakteristisch ist. Eine andere Probe wurde nach der Methode von Tollens und Oshima²⁾ zu gleichen Teilen mit konzentrierter Salzsäure versetzt und wenig Phloroglucinlösung zugegeben. Diese Reaktion ist weit empfindlicher, denn mit 10 Tropfen Destillat, 1 Tropfen Phloroglucinlösung und 10 Tropfen Salzsäure erhielt ich nach dem Verdünnen auf 20 ccm noch ein deutliches Absorptionsspektrum.

Nach der mehrmonatlichen Behandlung der Hauptmenge des Materials mit ganz verdünnter Natronlauge in der früher beschriebenen Weise wurde es mit 5%iger Schwefelsäure 6 Stunden gekocht, wodurch sich die Hemizellulosen lösen. Aus dieser Lösung wurde ein Sirup dargestellt, der sehr starke Furoreaktion gab, somit die nachgewiesenen Pentosen enthielt. Nach mehrmaligem Reinigen durch Alkohol wurde er auf Arabinose und Xylose getrennt untersucht.

Der eine Teil diente zur Darstellung des Bertrandischen

¹⁾ Widtsoe und Tollens, B. B., Bd. XXXIII, S. 143 (1900).

²⁾ Tollens und Oshima, B. B., Bd. XXXIV, S. 1425 (1901).

Bromkadmiumxylonats¹⁾ in der schon angegebenen Weise. Nach einigen Stunden hatten sich zahlreiche mikroskopische Kriställchen von Bromkadmiumxylonat gebildet.

Ein zweiter Teil des Sirups diente zur Darstellung des Arabinosebenzylphenylhydrazons nach Ruff.²⁾ 20 Tropfen Sirup wurden mit 2 ccm 70%igem Alkohol versetzt und hierzu eine Lösung von 20 Tropfen Benzylphenylhydrazin in 1 ccm absolutem Alkohol gegeben. Nach kräftigem Schütteln wurde die Flüssigkeit sich selbst überlassen. Am nächsten Tag hatten sich weiße Kristallkugeln gebildet, die aus 75%igem Alkohol umkristallisiert, schöne weiße Nadeln vom Schmelzpunkt 172° darstellten. (Schmelzpunkt 173°.)

Um etwa vorhandene Mannose nachweisen zu können, wurden 400 g gepulvertes Material mit 5%iger Schwefelsäure gekocht. Das neutralisierte und mit Tierkohle entfärbte Filtrat wurde eingedampft und mehrere Tage mit essigsauerm Phenylhydrazin stehen gelassen. Es entstand kein Niederschlag, wodurch die Abwesenheit von Mannose erwiesen war. Nach dem Erwärmen fiel reichlich Osazon aus, das bei 203° schmolz, also Dextroseosazon war. Der entstandene Traubenzucker stammte aber offenbar aus dem Inhalt der Mooszellen, der ja nicht entfernt worden war.

Der nach der Entfernung der Hemizellulosen bleibende Rückstand des Moores wurde nach Hoffmeister³⁾ mit der sechsfachen Menge Salzsäure (sp. Gew. 1,05) und soviel chlor-sauerm Kali versetzt, daß noch ein Teil ungelöst blieb. Nach eintägigem Stehen wurde die fast weiße Masse abfiltriert, gut ausgewaschen und mit sehr verdünntem Ammoniak behandelt. Die gut ausgewaschene und über Schwefelsäure getrocknete Masse wurde dann in der Kälte in 80%iger Schwefelsäure gelöst, nach einigem Stehen auf 3% freie Säure verdünnt und sechs Stunden gekocht.

Ein Teil des schließlich erhaltenen Sirups wurde mit essigsauerm Phenylhydrazin versetzt und 1 Tag stehen gelassen.

¹⁾ Bertrand, Bull. chim. (3. Serie), Bd. V, S. 554.

²⁾ Ruff, B. B., Bd. XXXII, S. 3234 (1899).

³⁾ Hoffmeister, Ref. in Just, Bot. Jahrb., 1888, Bd. I, S. 690.

Es entstand keine Fällung, wodurch auch bei der echten Zellulose die Abwesenheit von Mannose dargetan ist. Nach dem Erwärmen der Lösung auf dem Wasserbad entstand eine reichliche Menge Osazon, das nach zweimaligem Umkristallisieren aus Alkohol bei 203° schmolz, somit als Dextrosophenylosazon zu betrachten ist.

Ein anderer Teil des Sirups wurde mit Salpetersäure oxydiert und das saure Kaliumsalz der Zuckersäure dargestellt. Dieses wurde in das Silbersalz umgewandelt, dessen Analyse folgende Zahlen ergab:

Angew. Substanz: 0,5117 g }
 Gef. Silber: 0,2598 g } = 50,7%. (Berechnet: 50,9%.)

Daraus ergibt sich, daß eine Dextrosozellulose vorlag.

Zusammenfassung: Hemizellulosen: Xylan, Araban, Methylpentosan; Mannose ist nicht vorhanden. Echte Zellulose: Dextrosozellulose.

Mastigobryum trilobatum (L.).

Auch *Mastigobryum trilobatum* wurde seiner Zelleckverdickungen wegen, aus den schon geschilderten Gründen, zur Untersuchung ausgewählt, zumal es in einem Walde am Titisee (Schwarzwald) in großer Menge auftritt und von hier in fast beliebigen Quantitäten zur Verfügung stand.

Die Verarbeitung war genau die gleiche wie bei *Leioscyphus*, nur mit der Ausnahme, daß dieses Material reichlich mit Tannennadeln vermennt war, die zuerst ausgesucht werden mußten. Zu diesem Zweck wurden die Pflanzen zuerst getrocknet, dann ließ sich ein großer Teil der Nadeln durch Schütteln und Klopfen entfernen. Der Rest wurde sorgfältig durch Aussuchen beseitigt, was eine zwar mühsame, aber unbedingt notwendige Arbeit ist. Ein ätherisches Öl wurde wie bei *Leioscyphus* gewonnen.

Auch dieses Moos zeigte starke Furoolreaktion. Eine quantitative Analyse, in gleicher Weise wie bei der vorigen Pflanze ausgeführt, ergab folgende Zahlen:

0,5307 g bei 100° getrocknetes Moos gaben 0,0605 g Furoolphenylhydrazon
 = 0,0429 g oder 8,0% Pentosan.

Der Gehalt ist also ziemlich der gleiche, wie bei *Leioscyphus*.

Eine Probe wurde in der beschriebenen Weise unter Zusatz von Phloroglucin spektroskopisch auf Methylpentosen geprüft. Wie bei *Leioscyphus* wurde auch bei diesem Lebermoos eine deutliche Absorption des Spektrums von grün bis blau wahrgenommen, wodurch auch hierfür der Nachweis von Methylpentosen erbracht ist.

Das gepulverte Material wurde danach während 6 Monaten mit 0,5%iger Natronlauge bei Zimmertemperatur ausgezogen, öfters dazwischen mit Wasser gekocht, schließlich mit Alkohol und dann mit Äther behandelt. Als sich nach längerem Stehen die Lauge kaum mehr färbte, wurde das Material zunächst mit 5%iger Schwefelsäure gekocht, um die Hemizellulosen in Lösung zu bekommen. Nach 6stündigem Kochen zeigte der Rückstand keine Pentosanreaktion mehr. Die vom Moos abfiltrierte Lösung wurde mit Wasser aufs doppelte Volumen gebracht, nochmals einige Stunden erhitzt und dann mit Schlemmkreide neutralisiert. Der erhaltene Sirup wurde geteilt.

Der eine Teil des Sirups wurde nach Ruff mit Benzylphenylhydrazin auf Arabinose geprüft, wie bei *Leioscyphus* näher angegeben ist. Nach zweitägigem Stehen zeigten sich reichlich helle, kugelige Kristallwarzen, die bei 169° schmolzen. Nach dem Umkristallisieren aus Alkohol zeigten die nun schneeweißen, kleinen Nadeln den Schmelzpunkt 173°, der mit dem des Arabinosebenzylphenylosazons genau übereinstimmt.

Ein anderer Teil des Sirups wurde nach Bertrand mit Brom und Kadmiumcarbonat behandelt. Nach mehrstündigem Stehen erschienen Kristalle, die unter dem Mikroskop wetzsteinförmig aussahen, woraus auf Xylose geschlossen werden darf. Diese Reaktion wurde nochmals mit einer größeren Menge Sirup wiederholt. Nach Zusatz von Alkohol fiel bald ein Niederschlag aus, der sich nach eintägigem Stehen zu reichlichen weißen Nadeln umgebildet hatte. Diese wurden auf Ton abgepreßt und getrocknet. Sie verwitterten hierbei, was für Bromkadmiumxylylonat charakteristisch ist.

Auf Mannose wurde wie bei *Leioscyphus* vergeblich geprüft.

Der mit verdünnter Schwefelsäure ausgekochte Rückstand des Moores wurde getrocknet und dann mit Hoffmeisterschem Reagens behandelt. Nach eintägigem Stehen wurde das gebleichte Moos ausgewaschen, öfters mit verdünntem Ammoniak ausgekocht, getrocknet und in 78%iger Schwefelsäure gelöst. Wie bei *Leioscyphus* wurde ein Sirup gewonnen, der durch wiederholtes Lösen in Alkohol von anorganischen Bestandteilen befreit wurde. Ein Teil desselben wurde mit essigsaurem Phenylhydrazin versetzt und stehen gelassen. Es entstand kein Niederschlag, was die Abwesenheit von Mannose beweist. Nach dem Erwärmen schied sich reichlich ein Osazon ab, das nach zweimaligem Umkristallisieren aus Alkohol bei 204° schmolz, danach Dextrophenylosazon war.

Ein weiterer Teil des Sirups wurde mit Salpetersäure (spez. Gew. 1,15) oxydiert, wodurch ich Zuckersäure erhielt, deren Silbersalz analysiert wurde.

Angew. Substanz: 0,3248 g }
 Gef. Silber: 0,1650 g } = 50,8%. (Berechnet: 50,9%.)

Hierdurch ist sichergestellt, daß eine Dextrosozellulose vorliegt.

Zusammenfassung: Hemizellulose: Xylan, Araban, Methylpentosan; Mannose ist nicht nachweisbar. Echte Zellulose: Dextrosozellulose.

4. Laubmoose.

Winterstein¹⁾ zeigte vor 10 Jahren, daß die Zellulose eines Gemisches verschiedener Bryaceen bei der Hydrolyse Dextrose und Mannose liefere. Mannose wurde sonst selten bei echter Zellulose gefunden und der Umstand, daß auch verschiedene Farne nach Winterstein das Mannosemolekül zum Aufbau ihrer Wände benutzen, könnte die Ansicht aufkommen lassen, die Archegoniaten enthielten diesen Bestandteil in der Mehrzahl der Fälle. Da bei den nachfolgenden Laubmoosen, wie auch bei den untersuchten Lebermoosen keine Mannose nachzuweisen war, scheint auch bei den Archegoniaten Mannose nur ausnahmsweise vorzukommen.

¹⁾ Winterstein, Diese Zeitschrift, Bd. XXI, S. 152 (1895).

Außer der genannten Arbeit sind noch einige andere Mitteilungen über Zellwandbestandteile der Laubmoose in der Literatur zu finden. So beschreiben Draggendorff¹⁾ und Treffner²⁾ eine Metaarabinsäure, über deren chemische Natur man aber nichts Sicheres aussagen kann. Vielleicht liegt irgend ein Pektinstoff vor, wie sie häufig bei Moosen vorkommen. In neuerer Zeit hat Czapek³⁾ aromatische Membranbestandteile aus Laubmoosen dargestellt, die er Sphagnol und Dicranumberbsäure nannte.

Die Menge der Zellulose ist bei Leber- und Laubmoosen sehr verschieden. Nach Lohmann⁴⁾ enthalten die Laubmoose etwa sechsmal soviel als die Lebermoose, die nur etwa 11% Rohfaser, auf Trockensubstanz berechnet, aufweisen. Deshalb erfordert auch die Analyse der Laubmoose weniger Material, als die der Lebermoose.

Lignin fehlt nach meinen und anderen Untersuchungen auch den Laubmoosen. Auch die Blaufärbung der Zellulose mit Jodlösung und Schwefelsäure tritt nicht immer sofort ein. Nach Czapek ist dies durch die Anwesenheit der phenolartigen Körper begründet.

Sphagnum cuspidatum (Ehrh.).

Das Material stammt aus dem Hinterzartener Moor am Feldberg (Schwarzwald), von wo fast absolut reine Rasen von *Sphagnum cuspidatum* var. *plumosum* in großer Menge zu erhalten sind. Gleich von vornherein teilte ich die gesammelten Pflanzen in zwei Hälften. Die eine wurde auf Hemicellulosen untersucht, die andere mit Schulzeschem Reagens behandelt, um später auf Zellulosen geprüft zu werden.

Eine Probe wurde mit Salzsäure destilliert und im Destillat mit Anilin und Essigsäure Furool nachgewiesen. Die Rotfärbung war nicht sehr intensiv, woraus auf geringen Pentosangehalt geschlossen werden darf. Trotzdem versuchte ich eine genauere

¹⁾ Draggendorff, Analysen von Pflanzen, S. 88 (1882).

²⁾ Treffner, Chemie der Laubmoose, Diss. Dorpat 1881.

³⁾ Czapek, «Flora», 1899, S. 361.

⁴⁾ Lohmann, Bhft. Bot. Zentralbl., 1903, S. 230.

Charakterisierung der Pentosen. Zu diesem Zweck wurde der eine Teil des Materials ein halbes Jahr lang abwechselnd mit kalter, 0,5%iger Natronlauge und heißem Wasser behandelt. Zum Schluß wurde es mit Alkohol und Äther ausgekocht. Das zerkleinerte Moos wurde hierauf mit 3%iger Schwefelsäure etwa 10 Stunden erwärmt, dann abfiltriert. Die Sphagnumpflanzen zeigten nach dieser Behandlung keine Pentosanreaktion mehr. Das Filtrat wurde mit Baryumkarbonat neutralisiert, filtriert und eingedampft. Ich erhielt nur einen geringen Rückstand, aus welchem durch öfteres Behandeln mit Alkohol schließlich eine kleine Menge Sirup gewonnen wurde. Dieser Sirup zeigte nun sehr starke Furoolreaktion.

Um zu erfahren, welche Pentosen vorhanden seien, prüfte ich einen Teil mit der Bertrandschen Reaktion auf Xylose, den anderen nach Ruff auf Arabinose.

Nach Bertrand gab ich 2 Tropfen Sirup, 8 Tropfen Wasser, 1 Tropfen Brom zusammen und ließ die Mischung einen Tag stehen. Hierauf wurde die Flüssigkeit mit Kadmiumkarbonat gesättigt, das Brom verjagt und eingedampft. Nach Zusatz von Wasser wurde vom ungelöst Gebliebenen abfiltriert und das Filtrat mit gleichviel Alkohol versetzt. Nach einiger Zeit hatten sich Kristalle von der charakteristischen, wetzsteinförmigen Gestalt gebildet, wie sie für das Bromkadmiumxylonat angegeben werden.

Arabinose konnte ich unter den geschilderten Umständen nicht nachweisen, doch dürfte bei reichlicherem Material der Nachweis vielleicht doch noch gelingen.

Der mit Schulzeschem Reagens 14 Tage stehen gebliebene Teil des Materials sah nach wiederholtem Waschen schneeweiß aus. Die Masse wurde dann noch 1 Stunde mit einer Lösung von 50 ccm konzentriertem Ammoniak auf 1 l Wasser gekocht. Die einzelnen Zellen zerfallen hierbei und man erhält eine schleimige Masse, die abfiltriert und mit Wasser und Alkohol ausgewaschen wurde. Nach dem Trocknen im Exsikkator über Schwefelsäure wurde die nun grau aussehende Masse nach der Methode von Flechsig in Schwefelsäure gelöst. Die Verzuckerung geschah in der üblichen Weise mit 3%iger

Schwefelsäure. Sie war sehr langwierig, da im ganzen 30 l gekocht werden mußten. Die neutransierte und im Vacuumapparat bei 25° eingedampfte Zuckerlösung wurde durch wiederholtes Lösen in Alkohol von anorganischen Salzen befreit. Ein auf diese Weise dargestellter Sirup wurde zum Teil mit essigsaurem Phenylhydrazin versetzt und bei Zimmertemperatur (30°) stehen gelassen. Nach 24 Stunden hatte sich ein geringer dunkelgelber Niederschlag gebildet, der bei 183—184° schmolz, beim Umkristallisieren aber nur in unzureichender Menge zum Vorschein kam. Es ist nach alledem sehr unwahrscheinlich, daß ein Mannosephenylhydrazon vorlag, denn dieses müßte sich rascher gebildet haben und ist farblos.

Das Filtrat von diesem geringen Niederschlag wurde auf dem Wasserbad erwärmt, worauf sich bald ein reichlicher, gelber Niederschlag bildete, dessen Schmelzpunkt nach zweimaligem Umkristallisieren aus Alkohol bei 203—204° lag, bei welcher Temperatur auch ein Kontrollpräparat, aus reiner Dextrose dargestellt, schmolz.

Ein anderer Teil des Sirups wurde mit Salpetersäure (spez. Gew. 1,15) oxydiert und in bekannter Weise das Silber-salz der entstandenen Zuckersäure dargestellt.

0,0400 g zuckersaures Silber ergaben 0,0204 g Silber = 51,0%
(Berechnet: 50,9%.)

Hieraus erhellt mit Sicherheit, daß die Zellulose von Sphagnum ausschließlich Dextrose liefert. Wenn überhaupt Mannose darin vorkommt, ist die Menge sehr gering.

Zusammenfassung: Hemizellulose: Xylan; Zellulose: Dextrosozellulose.

Polytrichum commune (L.).

Ohne bestimmte Gründe, lediglich weil mir das Material bei Freiburg leicht zur Verfügung stand, habe ich als zweites Laubmoos *Polytrichum commune* gewählt. Das gesäuberte Material wurde mit einer Schere zerkleinert und abwechselnd mit Wasser gekocht und dann mit 0,5%iger Natronlauge in der Kälte behandelt. Sobald sich die Lauge dunkelbraun gefärbt hatte, wurde sie durch neue ersetzt. Es dauerte fast ein

Jahr, bis ich das Material zur Untersuchung benutzte, und auch dann war die Lauge in einigen Tagen wieder gefärbt. Ich durfte jedoch annehmen, daß das Protoplasma entfernt sei und daß die braune Farbe von einem Membranstoff herrühre.

Das frische Material wurde auf Furol geprüft. Mit Anilinacetat erhielt ich nur schwache Rotfärbung, woraus man schließen darf, daß Pentosane nur in geringer Menge vorhanden sind. Da sie bei meinen sonstigen Untersuchungen stets als Hemizellulosen vorhanden waren, wurde das ausgewaschene, mit verdünnter Natronlauge in der beschriebenen Weise vorbereitete Material mit 6%iger Schwefelsäure 6 Stunden gekocht, abfiltriert, das Filtrat aufs doppelte verdünnt, nochmals gekocht, dann mit Schlemmkreide neutralisiert und ein Sirup darzustellen versucht. Ich erhielt nur eine sehr geringe Menge, die, mit Salzsäure destilliert, Anilinacetat nicht rot färbte. Es waren also keine Pentosane vorhanden. Die geringen, anfangs nachgewiesenen Mengen sind wahrscheinlich durch die fast einjährige Behandlung mit verdünnter Natronlauge in Lösung gegangen.

Der dunkelbraune Rückstand des Mooses wurde 6 Stunden in Hoffmeisterschem Reagens liegen gelassen, in welchem er sich sehr bald hellgelb färbte. Nach öfterem Auswaschen wurde das gebleichte Moos in verdünntem Ammoniakwasser mehrmals erhitzt, in welchem sich die Pflanzen anfangs mahagonirot färbten, während die Filtrate tief rotbraun aussahen. Es ist demnach wohl ein aromatischer Bestandteil in den Membranen vorhanden, der in saurer Flüssigkeit nur schwach, in alkalischer dagegen rotbraun gefärbt ist. Ich habe diesen Bestandteil, der mit den von Czapek beschriebenen viel Ähnlichkeit hat, nicht näher untersucht. Er scheint einen wesentlichen Bestandteil der Membrane auszumachen.

Die möglichst gereinigte und schließlich im Trockenschrank getrocknete Zellulose wurde in 80%iger Schwefelsäure einen Tag stehen gelassen, dann auf 4%ige Säure verdünnt und hydrolysiert.

Der erhaltene, durch wiederholtes Lösen in Alkohol gereinigte Sirup wurde zum Teil mit essigsauerm Phenylhydrazin versetzt und 1 Tag stehen gelassen. Es hatte sich kein Mannose-

hydrazon gebildet. Beim Erwärmen schied sich ein Osazon aus, das nach dem Umkristallisieren bei 203° schmolz, also Dextrosophenylosazon war.

Ein anderer Teil des Sirups wurde mit Salpetersäure oxydiert. Ich erhielt hierdurch Zuckersäure, deren Silbersalz hergestellt und analysiert wurde.

Angew. Substanz: 0,3260 g }
Gef. Silber: 0,1649 g } = 50,6% (Berechnet: 50,9%.)

Auch hieraus erhellt, daß der Sirup aus Dextrose bestand.

Zusammenfassung: Hemizellulosen: Pentosane in sehr geringer Menge. Echte Zellulose: Dextrosozellulose. Ferner ist in den Membranen wahrscheinlich ein aromatischer Bestandteil reichlich vorhanden.

Beitrag zur Kenntnis der ätherischen Öle bei Lebermoosen.

Von

Karl Müller in Freiburg i. Br.

(Der Redaktion zugegangen am 1. Juni 1905.)

Über die sogenannten Ölkörper der Lebermoose sind im Laufe der Jahre schon zahlreiche Arbeiten erschienen, die alle den Zweck hatten, der chemischen Natur derselben näher zu treten.

Ähnliche Gebilde finden sich sonst nur selten im Pflanzenreich und vollkommen gleiche überhaupt nicht, ein Umstand, der die Untersuchung wesentlich erschwerte. Größere Mengen der Öle sind nur selten dargestellt und auch dann handelte es sich fast immer nur um einige Tropfen. Nach alledem ist es nicht wunderbar, daß die Ansichten über die chemische Natur der Ölkörper sehr weit auseinandergehen. Bei Lohmann,¹⁾ auf dessen verdienstvolle Arbeit noch öfter zurückzukommen sein wird, findet man die verschiedenen Ansichten darüber zusammengestellt. Zwischen stärke- und salzartigen Substanzen, zwischen Wachs, Harz, Inulin, ätherischem Öl, fettem Öl usw. wurde hin- und hergedeutet.

Holle²⁾ war meines Wissens der erste, der die Ölkörper als ein Gemenge von ätherischem Öl und Harz bezeichnete. Auch Lindberg³⁾ vertritt diese Ansicht. Pfeffer⁴⁾ untersuchte die Ölkörper verschiedener Arten, und auf Grund seiner Untersuchungen kam er zu dem Schluß, die Ölkörper der Lebermoose bestünden vorwiegend aus fettem Öl, dem wenig Protein-

¹⁾ Lohmann, Beihefte Bot. Zentralbl., Bd. XV, S. 215—256 (1903).

²⁾ Holle, Über die Zellenbläschen der Lebermoose, Heidelberg 1857.

³⁾ S. O. Lindberg, «Flora», 1862, S. 545.

⁴⁾ Pfeffer, Die Ölkörper der Lebermoose, «Flora», 1874, Nr. 1—3.

stoffe und Wasser beigemengt seien. Pfeffer zeigte ferner, daß die Ölkörper im Stoffwechsel der Pflanze als Abfallprodukte aufzufassen sind. Auf die Autorität Pfeffers hin wurde seine Ansicht die herrschende. Erst vor kurzer Zeit, als ich mich auch schon hiermit befaßte, erschien die schon erwähnte Arbeit Lohmanns. Während sich die früheren Bearbeiter meistens nur mit mikroskopischen Untersuchungen begnügt hatten, arbeitete Lohmann wieder mit größeren Quantitäten, die er aus mehreren Lebermoosen durch Wasserdampfdestillation darstellte. Aus der Arbeit Lohmanns und den im folgenden beschriebenen Untersuchungen geht mit größter Sicherheit hervor, daß die Pfeffersche, auch jetzt noch allgemein verbreitete Ansicht über die chemische Natur der Ölkörper bei Lebermoosen eine irrite ist.

Daß es sich um ätherische, nicht um fette Öle handelt, geht schon aus der Art ihrer Gewinnung, durch Wasserdampfdestillation, hervor.

Die mikroskopischen Verhältnisse, wie die Entstehung der Ölkörper, sind zum Teil in den angeführten Arbeiten beschrieben, zum Teil in weiteren Abhandlungen,¹⁾ auf die hier einzugehen ich nicht für nötig erachte, zumal ich dem schon Bekannten nichts Neues hinzuzufügen habe. Ich habe mich lediglich auf chemische Untersuchungen beschränkt, für die, bei dem Stande der Sache, das größte Bedürfnis vorlag.

Um eine hinreichende Menge Öl aus verschiedenen Arten erhalten zu können, sind sehr große Mengen einer bestimmten Art erforderlich, an deren Beschaffung bis jetzt die meisten Untersuchungen scheiterten. Da ich den moosreichen Schwarzwald schon seit einer Reihe von Jahren gerade mit Rücksicht auf das Vorkommen von Lebermoosen besuche, sind mir auch manche Stellen bekannt geworden, an denen eine bestimmte Art in Massenvegetation auftritt. Die Kenntnis solcher Stellen ist aber unbedingt erforderlich, um das zur Gewinnung erheb-

¹⁾ Man vergleiche hierzu: v. Küster, Die Ölkörper der Lebermoose und ihr Verhältnis zu den Elaioplasten, Diss. 1894; Rattray, Trans. of Bot. Soc. Edinburgh, Bd. XVI, S. 127; Wakker, Jahrbuch wiss. Bot., Bd. XIX, S. 486 (1888); Garjeanne, «Flora», 1903, S. 457 bis 482.

licherer Mengen Öl nötige Material zu beschaffen. Von den hier beschriebenen Ölen ist nur das aus *Mastigobryum* schon einmal in weit geringerer Menge von Lohmann dargestellt worden.

In der vorliegenden Arbeit sind nur Jungermanniaceen berücksichtigt worden, welche im Gegensatz zu den Marchantiaceen in fast allen Blattzellen Ölkörper enthalten.

Bei der Schwerflüchtigkeit und der dadurch bedingten notwendigen langen Dauer der Wasserdampfdestillation war es mir nicht möglich, alles Material im Laboratorium selbst zu destillieren. Umsomehr bin ich der Firma Fr. Fritzsche & Co., Fabrik ätherischer Öle in Hamburg, zu großem Dank verpflichtet, daß sie mir die Destillation eines Teiles von *Mastigobryum*, sowie der gesamten Menge *Madotheca* besorgte.

Öl aus *Mastigobryum trilobatum* (L.).

Das stattliche Lebermoos *Mastigobryum trilobatum* wächst beim Titisee in 10—20 cm hohen, weitausgedehnten Rasen. Während des Sommers 1904 sammelte ich davon etwa einen Zentner frisches Material, das getrocknet und von den vorhandenen Tannennadeln befreit wurde, was eine überaus mühsame und monatelang dauernde Arbeit war. Das lufttrockene Material betrug nur noch etwa 10% des frischen. Einen Teil davon destillierte ich anhaltend mit Wasserdampf und erhielt so 10 g Öl. Da die Ausbeute sehr schlecht war, übergab ich 3 kg getrocknetes Material der Firma Fritzsche & Co. in Hamburg zur Destillation und erhielt nach kurzer Zeit 28 g Öl zurück, entsprechend 0,93% der Trockensubstanz.

Die Farbe des Öles ist orangegelb. Der Geruch ist sehr intensiv, lange anhaftend und erinnert an den Duft in Tannenwäldern, der vielleicht zum Teil von derartigen Ölen herrührt. Auch mit Sandelholzöl und Cedernholzöl hat er gewisse Ähnlichkeit.

Bei dem von mir selbst destillierten Öl war das spezifische Gewicht bei 12° = 0,975. Diese Zahl stimmt annähernd mit der von Lohmann gegebenen (0,972 bei 16°) überein. Das

von Fritzsche & Co. destillierte Öl hatte bei 15° das spezifische Gewicht 0,945—0,947. Wie man sieht, weicht diese Zahl von der ersten ziemlich erheblich ab. Vielleicht ist der Grund in der zweckmäßigeren Destillationsweise zu suchen, die es erlaubt, auch die leichteren Anteile zu gewinnen, während diese bei der Destillation im kleinen verloren gehen.

Die optischen Eigenschaften sind von Lohmann nicht scharf angegeben. Im Dezimeterrohr zeigte das Öl von Fritzsche & Co. unverdünnt einen Drehungswinkel von + 12,20°.¹) Hieraus berechnet sich

$$[\alpha]_D = \frac{+ 12,20}{1 \times 0,947} = + 12,88^\circ$$

Eine 42,26%ige alkoholische Lösung wurde hierauf ebenfalls polarisiert. Das spezifische Gewicht war 0,858, der Drehungswinkel + 5,10°; hieraus ergibt sich

$$[\alpha]_D = \frac{100 \times 5,10}{1 \times 42,26 \times 0,858} = + 14,05^\circ$$

Als Mittel für die Drehung ergibt sich somit + 13,5°.

Bevor eine fraktionierte Destillation mit dem Öle ausgeführt wurde, stellte ich einige chemische Voruntersuchungen damit an.

25 g Öl wurden mit heißer Natriumbisulfitlösung durchgeschüttelt und aus dieser Lösung nach der Zersetzung mit Schwefelsäure etwaige Doppelverbindungen von Aldehyden oder Ketonen durch Äther ausgezogen. Nach dem Verdampfen des Äthers blieb nur eine winzige Spur zurück, die stark nach Harz roch und aus ammoniakalischer Silberlösung Silber abschied. Weiter konnten keine Reaktionen damit angestellt werden.

Wie Lohmann, konnte auch ich in dem Öle eine nennenswerte Menge freie Säure nicht nachweisen, ebenso enthält es keinen Stickstoff und Schwefel.

Die Lösung einer geringen Menge Öl in Eisessig gab auf Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure eine weinrote Färbung.

¹) Die Ablesung war nicht mit absoluter Schärfe auszuführen, da die 10 cm lange, ziemlich stark gefärbte Ölschicht die Helligkeitsunterschiede sehr schwer erkennen ließ.

1,04 g Öl wurden mit 10 ccm $n/2$ -alkoholischer Kalilauge $3/4$ Stunden am Rückflußkühler erhitzt, dann mit Wasser verdünnt und der Überschuß an Kali zurücktitriert. 0,2 ccm Kalilauge war verbraucht worden; die Verseifungszahl ist mithin 5,4.

Etwa 30 g Öl wurden mit einer hinreichenden Menge alkoholischer Kalilauge verseift, darauf mit Wasser verdünnt und das Öl von der alkalischen Flüssigkeit getrennt. Diese wurde hierauf mit Schwefelsäure angesäuert, wobei leichte Trübung und ein starker Geruch bemerkbar war. Der geringe Niederschlag wurde abfiltriert und in Äther gelöst. Nach dem Verdampfen des Äthers blieb sehr wenig einer bei 16° halbfesten Masse von unangenehmem Geruch zurück. Mit alkoholischer Bleiacetatlösung gab sie ein weißes, in Äther unlösliches Salz, das aber seiner geringen Menge wegen nicht weiter untersucht werden konnte.

Das saure Filtrat wurde destilliert. Das Destillat reagierte nicht sauer. Es war also keine flüchtige Fettsäure im Öl vorhanden gewesen.

Bei der hierauf vorgenommenen Destillation des mit Kali verseiften Öles gingen von 50 — 240° etwa 2 ccm gelbgrüne Flüssigkeit über, die äußerst intensiv unangenehm rochen. Bei 260° ging die Hauptmenge des Öles mit blaugrüner Farbe über. Erhitzt man noch höher, so erhält man tief schwarzblaue Tropfen, die spezifisch schwerer sind als die bis 260° übergegangenen Anteile und deshalb darin untersinken. Im Destillationskolben bleibt ein stark riechender, zäher Rückstand, der sich in Alkohol schwer, in Äther leicht löst. Er wurde nicht weiter untersucht.

Das über 260° übergehende Destillat wurde nochmals fraktioniert. Die Hauptmenge ging zwischen 260 — 265° über. Getrennt davon wurde das Destillat von 270 — 285° aufgefangen.

Untersuchung der Fraktion 260 — 270° . Das spezifische Gewicht des Öles betrug (bei 20°) 0,946. Eine der intensiven Farbe wegen sehr verdünnte 10,36%ige alkoholische Lösung vom spezifischen Gewicht 0,818 drehte $+2,20^{\circ}$. Daraus ergibt sich:

$$[\alpha]_D = \frac{100 \times 2,20}{1 \times 0,818 \times 10,36} = + 25,95^{\circ}$$

Eine Verbrennung ergab:

| | | | | |
|------------------------|----------|---|---|----------|
| Angew. Substanz: | 0,1689 g | } | = | 87,06% C |
| Gefundene Kohlensäure: | 0,5392 > | | | 12,65% H |
| Gefundenes Wasser: | 0,1924 > | | | 99,71% |

Die Fraktion ist also fast frei von Sauerstoffverbindungen und entspricht innerhalb der Fehlergrenzen der Formel $C_{10}H_{16}$ oder $C_{15}H_{24}$. Lohmann hat mit weitaus geringeren Mengen auch schon eine Trennung in einen Kohlenwasserstoff und einen Alkohol versucht, doch deshalb ohne Erfolg, weil er die Fraktion bei 270° analysierte, die schon sauerstoffhaltig ist, während der Kohlenwasserstoff hauptsächlich bei 260 — 265° übergeht.

Um zu entscheiden, welche der beiden genannten Formeln dem Kohlenwasserstoff zukäme, führte ich eine Oxydation aus.

4,5 g des Öles wurden in Eisessig gelöst und eine Lösung von 6,5 g Chromsäureanhydrid in Essigsäure dazugegeben. Es fand eine sehr lebhafte Reaktion statt. Die Mischung wurde auf dem Wasserbad $\frac{1}{2}$ Stunde erwärmt, dann mit Wasser versetzt und mit Äther durchgeschüttelt. Aus der getrockneten ätherischen Lösung wurde das Oxydationsprodukt gewonnen. K. P. bei 260° .

Eine Verbrennung des oxydierten Öles ergab folgende Zahlen:

| | | | | |
|------------------------|----------|---|---|----------|
| Angew. Substanz: | 0,2544 g | } | = | 79,54% C |
| Gefundene Kohlensäure: | 0,7420 > | | | 9,82% H |
| Gefundenes Wasser: | 0,2250 > | | | 10,64% O |

Hieraus ergibt sich die Formel $C_{10}H_{16}O$. Der Kohlenwasserstoff, von dem ich ausging, war demnach ein Terpen der Formel $C_{10}H_{16}$.

Ich versuchte Halogenadditionsprodukte des Kohlenwasserstoffs zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde ein Teil der Fraktion 260 — 265° in Chloroform gelöst und getrocknetes Chlor eingeleitet. Die Lösung wurde bald violettrot, später dunkelrot und endlich blaßrot gefärbt. Nach dem Abdestillieren des Chloroforms blieb eine nicht kristallisierbare Masse von intensivem Geruch zurück.

Untersuchung der Fraktion 270—285°. Eine 3,9%ige alkoholische Lösung vom spezifischen Gewicht 0,820 drehte im Dezimeterrohr + 1,35°. Hieraus berechnet sich:

$$[\alpha]_D = \frac{100 \times 1,35}{1 \times 3,9 \times 0,820} = + 42,21^\circ$$

Da diese Fraktion ebenso wie die vorhergehende weit stärker rechtsdrehend ist, als das ursprüngliche Öl, muß man annehmen, daß die nicht untersuchten niedrig siedenden Bestandteile oder vielleicht auch der Rückstand im Kolben ein niedriges spezifisches Drehungsvermögen besitzen oder vielleicht sogar linksdrehend sind.

Mit 0,1545 g dieser Fraktion wurde eine Verbrennung ausgeführt.

$$\left. \begin{array}{l} \text{Gefundene Kohlensäure: } 0,4675 \text{ g} \\ \text{Gefundenes Wasser: } 0,1682 \text{ g} \end{array} \right\} = 100 \frac{\begin{array}{l} 82,5\% \text{ C} \\ 12,1\% \text{ H} \\ 5,4\% \text{ O} \end{array}}$$

Da diese Zusammensetzung es wahrscheinlich macht, daß ein Gemenge von einem Alkohol mit einem Kohlenwasserstoff vorliege, wurde die geringe Menge nochmals fraktioniert und das Destillat von 275—280° gesondert aufgefangen. Wie die folgende Analyse zeigt, war die Vermutung richtig.

$$\left. \begin{array}{l} \text{Angew. Substanz: } 0,1935 \text{ g} \\ \text{Gefundene Kohlensäure: } 0,5916 \text{ g} \\ \text{Gefundenes Wasser: } 0,2212 \text{ g} \end{array} \right\} = 100 \frac{\begin{array}{l} 83,32\% \text{ C} \\ 12,71\% \text{ H} \\ 3,97\% \text{ O} \end{array}}$$

Aus dem Herabsinken des Sauerstoffgehaltes darf man wohl annehmen, daß auch diese Fraktion einen Kohlenwasserstoff darstellt, während die sauerstoffhaltige Verbindung dem Destillationsrückstand angehört. Mangel an Material ließ mich diese Frage nicht weiter verfolgen.

Zusammenfassung: In dem ätherischen Öl aus *Mastigobryum* ist der Hauptsache nach ein Kohlenwasserstoff der Formel $C_{10}H_{16}$ enthalten, der seinem Drehungsvermögen, seinem spezifischen Gewicht und seiner hohen Siedetemperatur nach mit keinem der bekannten Terpene übereinstimmt. Bei der Oxydation erhält man daraus ein ebenfalls sehr hoch siedendes Keton. Wahrscheinlich ist noch ein zweiter Kohlenwasserstoff enthalten, der sich durch höheren Siedepunkt, größeres

spezifisches Gewicht und stärkere Drehung von dem genannten unterscheidet.

Öl aus *Leioscyphus Taylori* (Hook).

Leioscyphus Taylori ist in Baden selten, aber trotzdem konnte ich hiervon am Feldberg, an einer Felswand, wo das Moos in Massenvegetation vorkommt, sehr große Mengen sammeln. In jeder Blattzelle findet man 5—6 große Ölkörper. Es ließ sich daraus der Schluß ziehen, daß die Pflanze reichlich ätherisches Öl liefern würde, was sich auch bewahrheitet hat.

Zunächst wurden einige Versuche angestellt, in welcher Weise die beste Ausbeute an Öl zu erhalten sei. Zu diesem Zweck wurde das Material einmal lufttrocken destilliert, das andere Mal, nachdem es bei 100° getrocknet und gepulvert war. Ferner wurde die Dauer der Destillation abgeändert. Die beste Ausbeute lieferte bei 100° getrocknetes und gepulvertes Material und zwar ergaben 197 g bei 20stündiger Destillation 3,148 g Öl = 1,6%. Bei nur 8stündiger Dauer der Destillation lieferten 150 g Moospulver 197 g Öl = 1,3%. Der größte Teil des Öles geht also ziemlich rasch über, ein kleiner Teil wird aber hartnäckig sehr lange Zeit zurückgehalten. Im ganzen erhielt ich 22,5 g Öl.

Außer dem hohen Gehalt an ätherischem Öl ist auch dessen blaugrüne Farbe für dieses Moos charakteristisch. Das Öl ist sehr dickflüssig und verharzt beim Stehen an der Luft. Sein Geruch ist sehr intensiv und haftet lange an; er läßt sich mit keinem bekannten vergleichen. Der Geschmack ist sehr unangenehm.

Das spezifische Gewicht des Öles bei 20° wurde einmal zu 0,978, das andere Mal zu 0,986 gefunden, es ist also sehr hoch.

Die Farbe des Öles war viel zu dunkel, um es ohne Verdünnungsmittel polarisieren zu können. Eine 25%ige alkoholische Lösung ließ noch kein Licht durch. Eine 9,03%ige Lösung gestattete eben noch den Drehungswinkel abzulesen, allerdings nicht ganz scharf; sie drehte — 0,25°; spezifisches Gewicht der Lösung 0,8048; Rohrlänge 10 cm. Daraus ergibt sich:

$$[\alpha]_D = \frac{100 \times -0,25}{1 \times 9,03 \times 0,8048} = -3,44^\circ$$

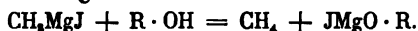
Nach der Feststellung der physikalischen Konstanten wurden mit dem Öle einige chemische Voruntersuchungen ausgeführt.

Freie Säuren, Schwefel und Stickstoff sind im Öl nicht vorhanden.

Der Versuch, ein Bromadditionsprodukt zu erhalten, lieferte eine schwarze, lackartige, sehr intensiv und angenehm riechende, aber unkristallisierbare Verbindung. Eine kristallisierte Nitrosoverbindung war gleichfalls nicht darstellbar.

Ein Tropfen Öl in 20 ccm Eisessig gelöst, gibt bei Zusatz von 1 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure oder Salzsäure eine tief himbeerrote Farbe, die nach längerem Stehen blaviolett wird. Die gleiche Reaktion gibt auch Santalen, doch darf man aus solchen Farbreaktionen nicht ohne weiteres auf die Gleichheit beider Körper schließen.

Nach der Methode von Tschugaeff¹⁾ wurden einige Tropfen des gut getrockneten Öls mit Methylmagnesiumjodid zusammengebracht, wodurch lebhafte Methanentwicklung eintrat, gemäß der Gleichung:



Die letztere Verbindung besaß eine salbenartige Beschaffenheit.

2,33 g Öl wurden mit alkoholischer, halbnormaler Kalilauge $\frac{3}{4}$ Stunden am Rückflußkühler erhitzt. Hierbei wurden 0,95 ccm Kali gebunden; die Verseifungszahl ist also 11,4.

Um weitere Anhaltspunkte über die Zusammensetzung des Öles zu erlangen, wurde eine Elementaranalyse ausgeführt:

| | | |
|------------------------|----------|--|
| Angew. Substanz: | 0,1481 g | } = \frac{100}{11,73} \begin{matrix} 84,18\% \text{ C} \\ 11,73\% \text{ H} \\ 4,09\% \text{ O} \end{matrix} |
| Gefundene Kohlensäure: | 0,4568 > | |
| Gefundenes Wasser: | 0,1564 > | |

Nach diesen Voruntersuchungen wurde das Öl auf dem Sandbade fraktioniert. Bis 260° ging fast nichts über. Von 260—265° wurde die erste größere Fraktion aufgefangen, die bei 264° längere Zeit überdestillierte. Zwischen 265° und

¹⁾ Tschugaeff, B. B., Bd. XXXV, S. 3912 (1903).

278° wurde die zweite Fraktion aufgefangen, die bei 275° nahezu konstant siedete und den größten Teil des Öles ausmachte. Die dritte Fraktion wurde zwischen 278° und 305° aufgefangen; sie ging hauptsächlich bei 290° über. Das Öl färbte sich bei der Destillation zuerst stahlblau, dann intensiv dunkelblau. Von der letzten Fraktion erhielt ich nur noch etwa 2 ccm. Der Rückstand im Kolben erstarrte nach kurzer Zeit zu einer zähen, braunen Masse.

Untersuchung der Fraktion 260—265°. Bei 20° hatte die Fraktion das spez. Gewicht 0,937. Eine 2,8%ige Lösung wurde polarisiert. Die Ablenkung betrug nur Bruchteile eines Grades und war der intensiven Färbung des Öles wegen nicht scharf ablesbar. Ich lege deshalb auf den zu — 22° berechneten Drehungswinkel nicht viel Wert, da bei der sehr verdünnten Lösung der geringste Ablesungsfehler den spezifischen Drehungswinkel in hohem Grade beeinflusst.

Zwei Analysen ergaben:

| | | | |
|------------------------|----------|-------------------------|----------|
| I. Angew. Substanz: | 0,1828 g | } = $\frac{100}{\quad}$ | 81,12% C |
| Gefundene Kohlensäure: | 0,5438 » | | 11,36% H |
| Gefundenes Wasser: | 0,1869 » | | 7,52% O |
| II. Angew. Substanz: | 0,2066 g | } = $\frac{100}{\quad}$ | 81,11% C |
| Gefundene Kohlensäure: | 0,6145 » | | 11,77% H |
| Gefundenes Wasser: | 0,2190 » | | 7,12% O |

Die Prozentzahlen stimmen auf die Formel $C_{15}H_{26}O$. Die Fraktion ist demnach ein Alkohol der Sesquiterpenreihe. Eine feste Benzoylverbindung konnte nach der Methode von Schotten und Baumann nicht erhalten werden. Weitere Reaktionen mußten aus Materialmangel unterbleiben.

Untersuchung der Fraktion 265—278°. Das spez. Gewicht der Fraktion war 0,964. Eine Analyse ergab:

| | | | |
|------------------------|----------|-------------------------|----------|
| Angew. Substanz: | 0,1243 g | } = $\frac{100}{\quad}$ | 85,10% C |
| Gefundene Kohlensäure: | 0,3879 » | | 11,17% H |
| Gefundenes Wasser: | 0,1250 » | | 3,73% O |

Die Fraktion war offenbar unrein und enthielt wahrscheinlich einen Kohlenwasserstoff und einen Alkohol. Sie wurde deshalb nochmals fraktioniert und die bei 275° übergehende Hauptmenge gesondert aufgefangen. Hiervon wurde eine Analyse ausgeführt:

| | | | |
|------------------------|----------|---------|----------|
| Angew. Substanz: | 0,2016 g | } = 100 | 86,70% C |
| Gefundene Kohlensäure: | 0,6409 > | | 12,13% H |
| Gefundenes Wasser: | 0,2201 > | | 1,17% O |

Aus dieser Analyse ist ersichtlich, daß der Sauerstoffgehalt abgenommen hat. Ein reines Terpen, wahrscheinlich der Formel $C_{15}H_{24}$ konnte jedoch nicht erhalten werden, denn wie die Untersuchung der nächsten Fraktion zeigt, ist diese auch sauerstoffhaltig, ebenso wie die Fraktion 260—265°. Die dazwischen liegende Fraktion 265—278° ist darum sehr schwer, rein zu erhalten.

Untersuchung der Fraktion 278—305°. Bevor ich mit dieser Fraktion eine Untersuchung anstellte, wurde sie nochmals fraktioniert und zwischen 280—290° das dunkelblaue Destillat aufgefangen.

Mit Natriumlicht war selbst bei einer 2,3%igen alkoholischen Lösung keine Ablesung im Polarisationsapparat möglich; ich benutzte deshalb weißes Licht (Auerbrenner) zur Polarisation. Spezifisches Gewicht der Lösung = 0,8112; Rohrlänge = 10 cm; Ablenkung + 0,5°, daraus ergibt sich:

$$[\alpha]_{\text{weiß}} = \frac{100 \times 0,5}{1 \times 2,3 \times 0,8112} = + 26,88^\circ$$

Weiterhin wurden zwei Analysen ausgeführt:

| | | | |
|------------------------|----------|---------|----------|
| I. Angew. Substanz: | 0,1471 g | } = 100 | 81,20% C |
| Gefundene Kohlensäure: | 0,4380 > | | 11,14% H |
| Gefundenes Wasser: | 0,1475 > | | 7,66% O |
| II. Angew. Substanz: | 0,1964 g | } = 100 | 81,34% C |
| Gefundene Kohlensäure: | 0,5858 > | | 10,69% H |
| Gefundenes Wasser: | 0,1890 > | | 7,97% O |

Beide Analysen stimmen innerhalb der Fehlergrenzen auf die Formel $C_{15}H_{26}O$. Wir haben also in dieser Fraktion wieder einen Alkohol, wie in der Fraktion 260—265°, der sich jedoch von dem ersten durch höheren Siedepunkt und wohl auch höheres spezifisches Gewicht und entgegengesetzte Drehung unterscheidet. Auch bei diesem Alkohol wurde vergeblich versucht, eine feste Benzoylverbindung zu erhalten.

Zusammenfassung. Das Leioscyphusöl weicht durch grüne Farbe, sehr hohes spezifisches Gewicht, durch reicheres

Vorkommen und durch seine höhere Verseifungszahl von den übrigen untersuchten ätherischen Ölen der Lebermoose ab.

Seiner chemischen Zusammensetzung nach besteht es aus zwei Alkoholen von der Formel $C_{15}H_{26}O$, die vielleicht die optischen Antipoden darstellen. Ein Kohlenwasserstoff — ob Terpen oder Sesquiterpen, bleibt eine offene Frage — ist ebenfalls vorhanden, der Alkohole halber aber schwer rein zu bekommen.

Öl aus *Madotheca levigata* (Schrad.).

Obwohl *Madotheca levigata* bei uns nicht häufig ist, wenn auch nicht so selten, wie die vorige Art, habe ich sie trotzdem als weiteres Objekt zur Untersuchung ausgewählt. Der Anlaß dazu war folgender. Lindberg¹⁾ hat schon im Jahre 1862 über das Öl dieses Lebermooses berichtet. Nach ihm ist es milchartig, undurchscheinend, destilliert merkbar erst über 100°. Es ist schwer flüchtig, was sich aus der langsamen Verdunstung eines Tropfen Öles auf Papier ergab, das den starken Geruch lange Zeit beibehält. In Wasser soll das Öl untersinken. Sein Geschmack ist scharf und lang haftend. Lindberg schließt mit folgenden Worten: «Möglicherweise variiert das Öl bei verschiedenen Arten von Lebermoosen, im allgemeinen dürfte die Veränderlichkeit doch keine große sein, da der Geschmack bei allen, die Schärfe ausgenommen, sehr ähnlich zu sein scheint.»

Die nachfolgenden Untersuchungen werden zeigen, daß Lindbergs Angaben nur teilweise der Wirklichkeit entsprechen. Lindberg hat eben mit weitaus geringeren Mengen gearbeitet als ich, deshalb seine abweichenden Angaben.

Das von mir benutzte Moos stammte aus dem oberen Donautal und aus dem Isartal bei München.²⁾ Es wurde an

¹⁾ Lindberg, «Flora», 1862, S. 545.

²⁾ Im Donautal zum Teil von mir, hauptsächlich aber von meinem Freund R. Neumann gesammelt. Aus dem Isartal, wo die Pflanze, wie ich mich selbst überzeugen konnte, sehr häufig ist, erhielt ich sie teilweise von Herrn Hauptlehrer M. Schinnerl in München, dem ich auch hier meinen besten Dank für die gehabte große Mühe auszusprechen nicht versäumen will.

der Luft getrocknet und von anhaftendem Humus und sonstigen Beimengungen gesäubert. Die Arbeit war im Vergleich zu der bei *Mastigobryum* sehr einfach.

Die Destillation von 3650 g lufttrockenem Material geschah durch die Fabrik Fritzsche & Co. Ich erhielt daraus 32,5 g Öl, was ungefähr 0,9% ausmacht.

In der Farbe gleicht das Öl dem aus *Mastigobryum*. Der Geruch ist angenehmer. Die frische oder auch getrocknete Pflanze schmeckt scharf nach Pfeffer und ist dadurch leicht von allen Verwandten unterscheidbar. Dieser Geschmack rührt aber nicht, wie ich erwartet hatte, vom ätherischen Öl her, da dieses ganz anders schmeckt. Das Öl ist dünnflüssiger, als die übrigen untersuchten. Bei 16° ist das spezifische Gewicht des Öles 0,856.

Im Dezimeterrohr polarisiert drehte das reine Öl + 62,25°. Daraus berechnet sich

$$[\alpha]_D = \frac{62,25}{1 \times 0,856} = + 72,74^\circ$$

Eine 50,2%ige alkoholische Lösung vom spezifischen Gewicht 0,823 drehte im Dezimeterrohr + 30,60°. Daraus findet man:

$$[\alpha]_D = \frac{100 \times 30,60}{1 \times 50,2 \times 0,823} = + 74,06^\circ$$

Kein anderes der untersuchten Öle aus Lebermoosen besitzt eine so starke Rechtsdrehung, wie das *Madotheca*-Öl.

Freie Säure, Stickstoff und Schwefel konnten hier ebenfalls nicht in dem Öl nachgewiesen werden.

Ein Tropfen Öl in viel Eisessig gelöst, gibt bei Zusatz von einem Tropfen konzentrierter Schwefelsäure sofort dunkelrote Färbung, die nach eintägigem Stehen in Braun übergeht. Mit konzentrierter Salzsäure ist die Färbung viel schwächer.

20 Tropfen des Öles wurden mit 4 ccm Alkohol und 4 ccm Äther versetzt, dann eine Lösung von 0,7 g Brom in Chloroform dazugegeben. Nach dem Abdampfen der Lösungsmittel blieb eine stark und angenehm riechende braune Masse zurück, die nicht kristallisierte. In Alkohol und in Äther war sie leicht löslich.

Mit dem Öl wurde eine Verbrennung ausgeführt:

| | | |
|------------------------|----------|--|
| Angew. Substanz: | 0,3524 g | } = $\frac{100}{100} \begin{matrix} 80,43\% \text{ C} \\ 12,49\% \text{ H} \\ 7,08\% \text{ O} \end{matrix}$ |
| Gefundene Kohlensäure: | 1,0392 > | |
| Gefundenes Wasser: | 0,3960 > | |

1,31 g Öl wurden durch 20 Minuten langes Erhitzen am Steigrohr mit alkoholischer $\frac{n}{s}$ -Kalilauge verseift, wobei 0,26 ccm Kalilauge gebunden wurden. Als Verseifungszahl ergibt sich hieraus 5,56.

Nach diesen Voruntersuchungen wurde das Öl fraktioniert und zwar diesmal, um Zersetzungen zu vermeiden, unter vermindertem Druck.

Bis 100° (25 mm) ging eine erhebliche Menge eines fast farblosen Bestandteiles über, der mit 96%igem Alkohol infolge Paraffinabscheidung einen geringen Niederschlag lieferte. Von 100° bis 150° (17 mm) ging fast gar nichts über. Von 150° bis 160° (17 mm) dagegen destillierte ein orangegelbes, zähflüssiges Öl über, das den Hauptbestandteil des Rohöles ausmachte. Bis 200° (15 mm) wurde destilliert. Der Rückstand im Kolben war gering. Er war dunkelgelb und wurde bald fest, ohne aber zu kristallisieren.

Untersuchung der Fraktion 50—100° (25 mm). Eine 13,64%ige alkoholische Lösung vom spezifischen Gewicht 0,800 drehte 1,15° nach rechts. Länge des Rohres 10 cm. Hieraus ergibt sich:

$$[\alpha]_D = \frac{100 \times 1,15}{1 \times 13,64 \times 0,800} = + 10,54^\circ$$

Weitere Untersuchungen konnten nicht ausgeführt werden. Das Öl war sehr flüchtig und roch nicht angenehm.

Untersuchung der Fraktion 150—160° (17 mm). Diese Fraktion roch sehr stark und nicht gerade unangenehm. Bei Atmosphärendruck lag der Siedepunkt bei 280°. Es fand Zersetzung statt, die sich durch Grünfärbung des Öles und unangenehmen Geruch kundgab.

Das spezifische Gewicht war 0,968 bei 15°.

Eine 8,32%ige Lösung der Fraktion in Alkohol wurde im Dezimeterrohr polarisiert. Ablenkung + 9°, spezifisches Gewicht der Lösung 0,818. Daraus ergibt sich:

$$[\alpha]_D = \frac{100 \times 9}{1 \times 8,32 \times 0,818} = + 132,23^\circ$$

War die Ablenkung des Lichtstrahles schon im Rohöl erheblich, so ist sie in dieser Fraktion noch viel bedeutender. Hierdurch steht das Madotheca-Öl unter allen anderen untersuchten Ölen der Lebermoose einzig da.

Mit der Fraktion wurden zwei Analysen ausgeführt:

| | | | |
|------------------------|----------|-------------------------|----------|
| I. Angew. Substanz: | 0,1387 g | } = $\frac{\quad}{100}$ | 79,3% C |
| Gefundene Kohlensäure: | 0,4032 g | | 11,2% H |
| Gefundenes Wasser: | 0,1387 g | | 9,5% O |
| II. Angew. Substanz: | 0,1892 g | } = $\frac{\quad}{100}$ | 79,77% C |
| Gefundene Kohlensäure: | 0,5534 g | | 10,55% H |
| Gefundenes Wasser: | 0,1798 g | | 9,68% O |

Als summarische Formel ergibt sich aus den beiden Analysen $C_{10}H_{18}O$. Da der Wasserstoffgehalt etwas geringer ist, als der Formel entspricht, wäre es auch möglich, daß eine Verbindung der Formel $C_{10}H_{16}O$, also ein Keton, vorläge. Deshalb wurde ein Teil des Öles mit Bisulfitlösung ausgeschüttelt. Es konnte keine Doppelverbindung von einem Keton mit Bisulfit nachgewiesen werden. Die Verbindung ist daher sehr wahrscheinlich ein Alkohol.

Um den Gehalt der Fraktion an freiem Alkohol zu erfahren, führte ich eine Acetylierung aus. Vorher wurde jedoch noch die Verseifungszahl des Öles bestimmt. 0,92 g der alkoholhaltigen Fraktion hatten nach der Verseifung 0,35 ccm $n/2$ -Kalilauge gebunden. Daraus ergibt sich die Verseifungszahl 10,76.

Hierauf wurden 6 g des alkoholhaltigen Öles mit 6 g Essigsäureanhydrid und 1 g wasserfreiem Natriumacetat 2 Stunden am Rückflußkühler gekocht, dann mit wenig Wasser noch $1/4$ Stunde erwärmt, um das überschüssige Essigsäureanhydrid zu zersetzen. Das mit Alkalikarbonatlösung ausgewaschene Öl wurde dann getrocknet.

1,07 g des acetylierten Öles brauchten zur Verseifung 1,8 ccm $n/2$ -Kalilauge, die Verseifungszahl ist also 47,1. Der Gesamtgehalt an Alkohol ($C_{10}H_{18}O$) berechnet sich hieraus zu 13,0%. Der Verseifungszahl 10,76 vor der Acetylierung ent-

spricht ein Alkoholgehalt = 2,95 %. Diese Zahl von 13,0 abgezogen gibt den Gehalt an freiem Alkohol zu 10,05 %.

Da die Verseifungszahl und damit der Gehalt an freiem Alkohol so unerwartet niedrig war im Vergleich zu dem Ergebnis der Elementaranalysen, wurden nochmals 4,165 g acetyliertes Öl verseift, wozu 6,9 ccm Kalilauge gebraucht wurden; hieraus ergibt sich in Übereinstimmung mit der vorherigen Bestimmung als Verseifungszahl 47,3.

Das bei der Verseifung zurückgewonnene, getrocknete, alkoholhaltige Öl wurde in Benzollösung mit Phtalsäureanhydrid verestert. Die geringe Menge Ester, die ich erhielt, sprach wiederum dafür, daß nur $\frac{1}{10}$ des Öles ein Alkohol war.

Über den nicht veresterbaren Teil dieser Fraktion konnte ich bis jetzt keine Klarheit erhalten.

Zusammenfassung: Das Madotheca-Öl hat ein verhältnismäßig geringes spezifisches Gewicht, das sich durch das reichliche Vorkommen an leichtflüchtigen, zum Teil wahrscheinlich paraffinartigen Bestandteilen erklärt. Die höher siedende Fraktion (280°) ist ein dickflüssiges Öl vom spezifischen Gewicht 0,968 (15°) und sehr starker Rechtsdrehung (+ 132°). Sie enthält einen Alkohol und zwar, wenn dieser die Zusammensetzung $C_{10}H_{18}O$ besitzt, 10 % davon. Die physikalischen Konstanten dieses sehr hochsiedenden neuen Körpers konnten aus Materialmangel nicht ermittelt werden. Den erheblichen nicht veresterten Rest dieser Fraktion konnte ich nicht aufklären.

Öl aus *Alicularia scalaris* (Corda).

Diese Pflanze wählte ich aus, weil sie in jeder Zelle der Blätter zahlreiche, große Ölkörper enthält. Sie findet sich im Schwarzwald in einer Höhe über 1000 Meter in ziemlicher Menge, hauptsächlich auf kiesiger Erde in feuchter Atmosphäre. Das von mir verarbeitete Material stammt aus dem oberen Bärenthal am Feldberg. In frischem Zustande riecht die Pflanze kaum und läßt sich durch diese Eigenschaft von der sehr ähnlichen, stark und angenehm duftenden *Aplozia obovata* leicht unterscheiden.

Da es unmöglich war, die anhaftende Erde ganz zu be-
seitigen, habe ich auch keine quantitative Bestimmung über
den Ölgehalt ausführen können. Im ganzen erhielt ich ungefähr
3 g Öl.

Die Farbe ist citronengelb. Der Geruch ist von den
anderen ätherischen Ölen, die ich dargestellt habe, wenig ver-
schieden und erinnert an den Waldduft.

Bei der geringen Ölmenge konnte ich natürlich eine ein-
gehende Untersuchung nicht durchführen. Die folgenden Angaben
lassen aber zur Genüge erkennen, daß auch dieses Öl von den
übrigen bedeutend abweicht.

Das spezifische Gewicht betrug bei 15° 0,965.

Eine 8,58%ige Lösung des Öles in Alkohol, mit dem
spezifischen Gewicht 0,8167 (bei 20°), wurde im Dezimeterrohr
polarisiert. Sie drehte die Polarisationssebene um — 2,35°.
Hieraus ergibt sich:

$$[\alpha]_D = \frac{100 \times -2,35}{1 \times 8,58 \times 0,8167} = -33,49^\circ$$

Mit Eisessig und konzentrierter Schwefelsäure gab ein
Tropfen Öl eine sehr beständige, himbeerrote Farbe.

Eine Verbrennung ergab folgende Werte:

| | | | |
|------------------------|----------|---------|----------|
| Angew. Substanz: | 0,1301 g | } = 100 | 81,16% C |
| Gefundene Kohlensäure: | 0,3872 > | | 11,71% H |
| Gefundenes Wasser: | 0,1342 > | | 7,13% O |

Das Öl entspricht also fast genau der Zusammensetzung
 $C_{15}H_{26}O$.

In der folgenden Tabelle sind die Eigenschaften der vor-
stehend beschriebenen Öle nochmals zusammengefaßt, um die
verschiedene Zusammensetzung jedes einzelnen Öles besser zum
Ausdruck zu bringen.

Die untersuchten Öle der Lebermoose haben gemeinsam
ein hohes spezifisches Gewicht, hohe Siedetemperatur und damit
verbundene Schwerflüchtigkeit. Ein Ölfleck auf Papier ver-
schwindet erst nach mehreren Monaten.

| | Mastigobryum | Leioscyphus | Madotheca | Alicularia |
|--|--|--|---|---------------------------------------|
| Vorkommen
in % | 0,93 | 1,6 | 0,9 | — |
| Farbe
des Öls | orangegelb | blaugrün | orangegelb | citronengelb |
| Spez.
Gewicht | 0,947—0,975 | 0,986 | 0,856 | 0,965 |
| $[\alpha]_D$ | + 13,46° | — 3,44° | + 73,4° | — 33,49° |
| Ver-
seifungs-
zahl | 5,4 | 11,4 | 5,56 | — |
| Eisessig +
konz. H ₂ SO ₄ | weinrot | himbeerrot | dunkelrot | himbeerrot |
| Zusammen-
setzung
des Öles | 82,77% C
11,19% H
100 — 6,04% O | 84,18% C
11,73% H
100 — 4,21% O | 80,43% C
12,49% H
100 — 7,08% O | 81,16% C
11,71% H
100 — 7,13% O |
| I. Fraktion | K. P. 260—265°
Sp. Gew. 0,946
$[\alpha]_D = +25,95^\circ$
C ₁₀ H ₁₆ | K. P. 260—265°
Sp. Gew. 0,937
C ₁₀ H ₁₆ O | K. P. 100° (25 mm)
$[\alpha]_D = +10,54^\circ$ | — |
| II. Fraktion | K. P. 270—285°
Sp. Gew. 0,964
$[\alpha]_D = +42,21^\circ$
Kohlenwasser-
stoff? | K. P. 265—278°
unrein,
wahrscheinlich
ein Kohlen-
wasserstoff | K. P. 150—160°
(17 mm)
Sp. Gew. 0,968
$[\alpha]_D = +132,23^\circ$
22% davon ein
Alkohol C ₁₀ H ₁₈ O | — |
| III. Fraktion | — | K. P. 280—290°
$[\alpha]_D = +26,88^\circ$
C ₁₀ H ₁₆ O | — | — |

Sehr viele Lebermoose besitzen im frischen Zustand einen sehr deutlichen Geruch, der bei manchen Arten als angenehm zu bezeichnen ist, wie z. B. bei *Aplozia obovata*, *Fegatella conica*, *Lophozia bicrenata*, *Grimaldia barbi-frons* usw. Bei allen stark riechenden Arten ist der Geruch

verschieden und kann deshalb oft dazu dienen, nahestehende Pflanzen zu unterscheiden. Manche Arten riechen fast gar nicht und enthalten trotzdem erhebliche Mengen ätherischen Öles, wie z. B. *Leioscyphus*. Nur sehr wenige Arten der Lebermoose besitzen nach unseren heutigen Kenntnissen keine Öle wie *Blasia* und *Anthoceros*.

Der Gehalt an ätherischem Öl ist bei verschiedenen Lebermoosarten sehr verschieden. Wie wir schon gesehen haben, lassen sich aus der Intensität des Geruches keine Schlüsse auf den Gehalt an Öl ziehen. Wohl aber ist dies möglich nach der Gestalt und Anzahl der Ölkörper. Bei den von Lohmann untersuchten Marchantiaceen ist der Gehalt an ätherischem Öl, auf Trockensubstanz berechnet, etwa 0,5%. Bei einem anderen Lebermoos, bei *Metzgeria*, ist ein Gehalt von nur 0,01% angegeben, der bei Destillation größerer Mengen sich vielleicht noch etwas höher herausstellen dürfte. Bei den beläuterten *Jungermanniaceen* fand ich fast 1%. Nur bei einer Art, bei *Leioscyphus*, konnte ein höherer Gehalt, bis 1,6%, festgestellt werden.

Nach andauernder Destillation mit Wasserdampf ist das Öl aus den Ölkörpern verschwunden, während es nach Pfeffers Beobachtungen an Menge kaum abgenommen haben soll.

Chemisch sind die Öle der einzelnen Arten überaus verschieden und damit hängt auch ihr verschiedenes Drehungsvermögen zusammen. Sie bestehen aus einem Gemenge von Terpenen mit Terpenalkoholen oder Sesquiterpenen und Sesquiterpenalkoholen, die, wie es scheint, mit keinem der zahlreichen bekannten Kohlenwasserstoffe oder Alkohole übereinstimmen. Auch ein bei 300° nicht flüchtiges, vielleicht kampherartiges Produkt ist in jedem Öl enthalten. Esterartige Verbindungen enthalten die einzelnen Öle jeweils sehr wenig.

Unter den Umsetzungsprodukten der Öle gelang es mir nicht, irgend eine feste Verbindung zu erhalten, wodurch die Untersuchung wesentlich vereinfacht worden wäre.

Sieht man die zusammenfassenden Werke und Aufsätze über ätherische Öle durch, so findet man bezüglich ihres Vorkommens bei Kryptogamen meistens unrichtige Angaben. Bei

Gildemeister und Hoffmann¹⁾ ist von Kryptogamen nur *Aspidium filix mas* unter den ätherischen Ölen gebenden Pflanzen angeführt. Die Lohmannsche Arbeit konnte hier noch nicht berücksichtigt werden, da sie erst später erschienen ist; die älteren Angaben über das Vorkommen ätherischer Öle bei Lebermoosen, an und für sich schon ziemlich unbestimmt, sind aber, wie schon eingangs erwähnt, durch die Autorität Pfeffers ganz unbeachtet geblieben. Aber auch neuere Werke, wie das von Cohn,²⁾ stehen noch auf dem gleichen Standpunkt. Cohn schreibt u. a. Seite 23: «In nennenswerten Mengen werden Riechstoffe nur von höher organisierten Pflanzen produziert» und weiterhin: «Nur Phanerogamen liefern ätherische Öle.» In ähnlichem Sinne spricht sich Detto³⁾ aus, wenn er sagt: «Kryptogamen und Palmen scheinen überhaupt keine ätherischen Öle zu enthalten.»

Aus meinen Untersuchungen, wie auch aus denen Lohmanns, geht demgegenüber unzweifelhaft hervor, daß ätherische Öle bei Kryptogamen nicht nur vorkommen, sondern bei einer bestimmten Abteilung derselben, den Lebermoosen, eine anscheinend ganz allgemeine Verbreitung besitzen. Sehr wahrscheinlich würde man sie auch noch bei anderen Kryptogamen finden, wenn sich nur das nötige Untersuchungsmaterial beschaffen ließe. So liefern z. B. viele Bakterien Riechstoffe, die aber eben aus Mangel an Material chemisch noch recht wenig untersucht sind. Der bekannte «Veilchenstein», eine Alge, die rote Flecken auf Felsen der europäischen Gebirge bildet, scheint ebenfalls den angenehmen Veilchenduft einem ätherischen Öl zu verdanken. Leider konnte ich ein etwa vorhandenes Öl nicht isolieren, da es mir ganz unmöglich war, genügende Mengen Material zusammenzubringen.

Wenn es erlaubt ist, aus den wenigen bisher vorliegenden Arbeiten weitergehende Schlüsse zu ziehen, so darf man wohl sagen, daß der Chemie der ätherischen Öle auch bei den Kryptogamen noch ein weites Arbeitsfeld offensteht, ein Gebiet,

¹⁾ Gildemeister u. Hoffmann, Die ätherischen Öle, Berlin 1899.

²⁾ Cohn, Die Riechstoffe, Braunschweig 1904.

³⁾ Detto, Naturw. Wochenschr., N. F., Bd. III, S. 322 (1904).

das dem bei den höheren Pflanzen an Ausdehnung und Mannigfaltigkeit vielleicht nicht viel nachstehen wird.

Die beiden vorstehenden Arbeiten wurden im chemischen Universitäts-Laboratorium (Abteilung der philosophischen Fakultät) zu Freiburg i. Br. ausgeführt.

Herrn Privatdozenten Dr. W. Meigen bin ich zu Dank verbunden für die mir jederzeit gewährten freundlichen Ratschläge. Ebenso spreche ich Herrn Prof. Dr. L. Gattermann, sowie auch Herrn Prof. Dr. F. Oltmanns für die Förderung meiner Arbeiten meinen wärmsten Dank aus.

Über das Schicksal des Vanillins im Tierkörper.

Von

Y. Kotake.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität zu Kyoto.)
(Der Redaktion zugegangen am 2. Juni 1905.)

Preusse¹⁾ hat zuerst das Verhalten des Vanillins im tierischen Organismus untersucht und er ist zu dem Resultate gelangt, daß das verabreichte Vanillin zu Vanillinsäure oxydiert wird, welche zum größten Teile gepaart als Ätherschwefelsäure, in geringer Menge als freie Säure im Harne auftritt. Bei dieser Untersuchung hat er es nicht versäumt, seine Aufmerksamkeit auf «einen die Polarisationssebene drehenden oder Kupferoxyd reduzierenden Körper» zu richten, doch ist es ihm nicht gelungen, eine Spur einer derartigen Verbindung im Harne aufzufinden.

So interessant und lehrreich die Beobachtung Preusses in betreff der Bildung von Ätherschwefelsäure nach Vanillinfütterung ist, so trifft doch seine Angabe über das Fehlen der linksdrehenden Substanz im Harne unter denselben Verhältnissen nicht zu. Denn Prof. Araki teilte mir mit, daß er, als er Kaninchen zum Zwecke anderweitiger Untersuchungen Vanillin beigebracht hatte, danach das Auftreten von einem linksdrehenden Körper im Harne gesehen habe. Die Darstellung dieses linksdrehenden Körpers und die Ermittlung der Eigenschaften und Konstitution desselben bilden den Gegenstand der folgenden Untersuchung.

Als Versuchstier benutzte ich Kaninchen. Das zu den Versuchen verwendete Vanillin war in feinen farblosen Nadeln kristallisiert, deren Schmelzpunkt bei 81° C. lag. Dieses Präparat wurde Kaninchen 3 bis 4 Tage lang in Dosen von 2 g pro die, in Wasser aufgeschwemmt, mittels des Schlundrohrs in den Magen eingeführt.

¹⁾ Preusse, Diese Zeitschrift, Bd. IV, S. 213.

Der nach Eingabe von Vanillin entleerte Harn drehte stets die Ebene des polarisierten Lichtes nach links; er reduzierte alkalische Kupferoxydlösung nicht, wohl aber trat Reduktion ein nach dem Kochen mit verdünnten Mineralsäuren. Die sonstigen Eigenschaften des Vanillinharns stimmten völlig mit den Angaben von Preusse überein.

Darstellung des linksdrehenden Körpers.

Nachdem ich durch einen besonderen Versuch festgestellt hatte, daß der in Rede stehende Körper nicht durch neutrales, wohl aber durch basisches Bleiacetat fast quantitativ gefällt wird, verfuhr ich wie folgt: Der Harn wurde mit neutralem Bleiacetat gefällt, filtriert und dann vorsichtig mit basischem Bleiacetat versetzt. Der mit basischem Bleiacetat erhaltene Niederschlag wurde nach der Vorschrift von E. Fromm und P. Clemens¹⁾ mit Baryumsulfid zerlegt und das vom Schwefelblei befreite Filtrat im Vacuum bei 33—40° C. eingeeengt. Aus dieser eingeeengten Flüssigkeit wurde die Baryumverbindung des gesuchten Körpers durch Zusatz von Alkohol gefällt und durch wiederholte Auflösung in Wasser und Umfällung mit Alkohol gereinigt.

Die Versuche für die Gewinnung der freien linksdrehenden Säure, die in großer Anzahl ausgeführt wurden, scheiterten daran, daß die Säure im freien Zustande nicht sehr beständig war und darum nicht völlig gereinigt werden konnte. Ich faßte deshalb den Entschluß, durch die Untersuchung des Baryumsalzes, welches wegen der Einfachheit seiner Darstellung den Vorzug vor den anderen Salzen hat, einen Aufschluß über die Eigenschaften und Konstitution der Säure zu erstreben.

Eigenschaften und Konstitution des linksdrehenden Körpers.

Das gereinigte Baryumsalz der gesuchten Substanz bildete ein weißes Pulver. In Wasser löste es sich sehr leicht und im frisch gefällten Zustande war es hygroskopisch. In Alkohol und Äther war es unlöslich.

¹⁾ E. Fromm und P. Clemens, Diese Zeitschrift, Bd. XL, S. 255.

Das Baryumsalz gab mit Phloroglucin und Salzsäure die Reaktion der gepaarten Glukuronsäure. Das Kupferoxyd in alkalischer Lösung wurde nicht durch die Substanz reduziert.

Die Analysen des Baryumsalzes gaben folgende Werte:

0,2176 g der bei 100° C. getrockneten Substanz mit Schwefelsäure abgeraucht gaben 0,1030 g $\text{BaSO}_4 = 27,86\%$ Ba.

0,2250 g Substanz bei 100° C. getrocknet und mit Schwefelsäure abgeraucht lieferten 0,1069 g $\text{BaSO}_4 = 27,96\%$ Ba.

0,2001 g der bei 100° C. getrockneten Substanz in Wasser gelöst und mit Schwefelsäure gefällt gaben 0,0935 g $\text{BaSO}_4 = 27,51\%$ Ba.

0,2288 g der bei 100° C. getrockneten Substanz in Wasser gelöst und mit Schwefelsäure gefällt gaben 0,1071 g $\text{BaSO}_4 = 27,55\%$ Ba.

0,1919 g Substanz (im Vacuum über Schwefelsäure getrocknet) gaben 0,2380 g $\text{CO}_2 = 33,83\%$ C und 0,0669 g $\text{H}_2\text{O} = 3,87\%$ H.

0,2002 g der im Vacuum über Schwefelsäure getrockneten Substanz gaben 0,2466 g $\text{CO}_2 = 33,59\%$ C und 0,0702 g $\text{H}_2\text{O} = 3,90\%$ H.

0,2320 g der bei 100° C. getrockneten Substanz gaben 0,2869 g $\text{CO}_2 = 33,73\%$ C und 0,0726 g $\text{H}_2\text{O} = 3,48\%$ H.

Es werden gefunden:

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | Mittel: |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------|
| C | — | — | — | — | 33,83 | 33,59 | 33,73 | 33,72 |
| H | — | — | — | — | 3,87 | 3,90 | 3,48 | 3,75 |
| Ba | 27,86 | 27,96 | 27,51 | 27,55 | — | — | — | 27,72 |

Die Analysen stimmen, wie aus der obigen Zusammensetzung zu ersehen ist, ziemlich gut miteinander überein. Aus den Mittelwerten berechnet sich folgende Formel:

Berechnet für $\text{BaC}_{16}\text{H}_{10}\text{O}_{11}$:

C 33,78%

H 3,22%

Ba 27,62%

Gefunden:

33,72%

3,75%

27,72%

Die spezifische Drehung des Baryumsalzes in wässriger Lösung wurde mittels eines Landolt'schen Circumpolarisationsapparates aus der Werkstätte von Fr. Schmidt und Hänsch bestimmt.

Gehalt an Substanz in 100 g Lösung = 1,6160 g; spezifisches Gewicht der Lösung = 1,0129; Rohrlänge = 1 dm; beobachtete Drehung bei 19,5° C. = — 0,62. Daraus ergab sich:

$$[\alpha]_D = - 37,94^\circ.$$

Aus den analytischen Daten und den geschilderten Eigenschaften läßt sich mit großer Wahrscheinlichkeit schließen, daß die linksdrehende Substanz eine gepaarte Glukuronsäure ist, die ich vorläufig als Glukurovanillinsäure bezeichnen will. Zur Feststellung der Konstitution war die Untersuchung der Spaltungsprodukte derselben nötig.

Spaltung.

20 g des Baryumsalzes wurden mit 400 ccm 5%iger Schwefelsäure übergossen, von gebildetem Baryumsulfat abfiltriert und dann 6 Stunden lang am Rückflußkühler auf dem Sandbade gekocht. Das Reaktionsgemisch wurde mit Äther in der Schüttelmaschine auf das gründlichste extrahiert und die Ätherauszüge destilliert. Es hinterblieb eine gefärbte kristallinische Substanz, welche durch Umkristallisation aus heißem Wasser unter Zusatz von Tierkohle gereinigt wurde.

Die gereinigte Substanz kristallisierte in feinen Nadeln, welche bei 207° C. schmolzen und unzersetzt sublimierten; sie löste sich schwer in kaltem, leichter in heißem Wasser, in Alkohol und Äther war sie leicht löslich. Die Lösung reagierte stark sauer.

Die Elementaranalyse und Molekulargewichtsbestimmung der bei 105° C. getrockneten Substanz ergaben Zahlen, welche für Vanillinsäure gut stimmen:

0,2159 g Substanz gaben 0,4496 g CO₂ = 56,79% C
 und 0,0902 g H₂O = 4,64% H.
 0,2529 g Substanz gaben 0,5274 g CO₂ = 56,87% C
 und 0,1053 g H₂O = 4,62% H.

Die Molekulargewichtsbestimmung wurde nach der Gefrier-
 methode von Beckmann ausgeführt unter Anwendung von
 Eisessig als Lösungsmittel.

| Eisessig | Substanz | △ | Gefundenes Molekulargewicht | |
|----------|-------------------|--|-----------------------------|--------|
| 25,95 g | 0,1550 g | — 0,145 | 161 | |
| | Berechnet für | | Gefunden: | |
| | | C ₈ H ₆ O ₄ : | 1. | 2. |
| | C | 57,14% | 56,79% | 56,87% |
| | H | 4,76% | 4,64% | 4,62% |
| | Molekulargewicht: | 168 | 161 | — |

Die mit Äther erschöpfte Flüssigkeit wurde zunächst mit Barytwasser, dann mit Baryumkarbonat neutralisiert, filtriert und bei 40° C. eingeeengt. Aus der eingeeengten Lösung wurde das Kaliumsalz durch Umsetzung des Baryumsalzes mit Hilfe von Kaliumsulfat dargestellt.

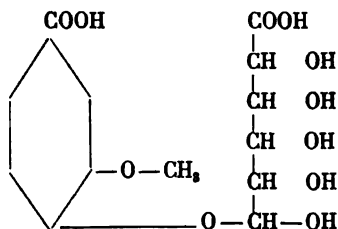
Das Kaliumsalz kristallisierte in feinen Nadeln und war leicht löslich in Wasser, unlöslich in Alkohol und Äther. Die wässrige Lösung reduzierte alkalische Kupferoxydlösung beim Kochen und drehte stark die Ebene des polarisierten Lichtes nach rechts.

Die im Vacuum über Schwefelsäure bei 95° C. getrockneten Kristalle gaben bei der Analyse folgende Werte:

0,2032 g Substanz mit Schwefelsäure abgeraucht gaben 0,0751 g K_2SO_4
 $= 16,60\%$ K.
 0,2178 g Substanz gaben 0,2459 g CO_2 $= 30,79\%$ C und 0,0762 H_2O
 $= 3,89\%$ H.

| Berechnet für $C_8H_8O_7K$: | | Gefunden: |
|------------------------------|--------|-----------|
| C | 31,01% | 30,79% |
| H | 3,88% | 3,89% |
| K | 16,86% | 16,60% |

Somit ist mit Sicherheit erwiesen, daß beim Kochen mit verdünnter Schwefelsäure die Glukurovanillinsäure als Spaltungsprodukte Vanillinsäure und Glukuronsäure gibt. Da nun außer diesen zwei Säuren keine andere Verbindung im Reaktionsgemisch nachzuweisen war, und da auf Grund der Analysen dem glukurovanillinsauren Baryum die Formel: $BaC_{14}H_{16}O_{11}$ zukommt, so wird es wohl nicht zu gewagt erscheinen, wenn wir die Konstitution der Glukurovanillinsäure durch die folgende Formel ausdrücken wollen:



Sollte diese Konstitutionsformel zutreffend sein, so würde die Spaltung der Glukurovanillinsäure scheinbar ohne Wasser-

aufnahme erfolgen. Es liegen einzelne Beobachtungen vor, die dafür sprechen, daß die Bildung von gepaarten Glukuronsäuren ohne Austritt von Wasser stattfinden und die Spaltung derselben auch ohne Aufnahme von Wasser verlaufen kann. So hat Blum¹⁾ gezeigt, daß bei der Spaltung der Dichlorthymolglukuronsäure das Dichlorthymol und die Glukuronsäure ohne Wasseraufnahme entstehen. Dieser Befund ist von Hata und Katsuyama²⁾ bestätigt und erweitert worden. v. Fenivessy³⁾ hat ferner beobachtet, daß die Paarung des Carbestyrls an Glukuronsäure im Tierkörper ohne Wasseraustritt vor sich geht. Was die Erklärung dieser merkwürdigen Erscheinungen anbetrifft, so glaube ich mit Blum annehmen zu müssen, daß die Aldehydgruppe der Glukuronsäure zunächst ins Hydrat $\text{CH}(\text{OH})_2$ verwandelt und das letztere unter Wasserabspaltung mit den zugehörigen Alkoholen in Reaktion getreten ist, und daß bei der Spaltung der auf diese Weise gebildeten gepaarten Glukuronsäuren nicht das Glukuronsäurehydrat, sondern die gewöhnliche Glukuronsäure auftritt.

Die Resultate der vorliegenden Arbeit lassen sich in folgende Sätze zusammenfassen:

1. Das Vanillin wird im Tierkörper zu Vanillinsäure oxydiert und die letztere zum Teile an Glukuronsäure gepaart und im Harne ausgeschieden.

2. Die Glukurovanillinsäure wird aus ihrer Lösung durch den Zusatz von basischem Bleiacetat gefällt; sie ist linksdrehend und reduziert nicht alkalische Kupferoxydlösung.

3. Die Glukurovanillinsäure wird beim Kochen mit verdünnter Schwefelsäure unter Bildung von Vanillinsäure und Glukuronsäure gespalten.

¹⁾ Blum, Diese Zeitschrift, Bd. XVI, S. 514.

²⁾ Hata und Katsuyama, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXI, S. 2583.

³⁾ v. Fenivessy, Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 552.

Zur Kenntnis der Extraktivstoffe der Muskeln.

II. Mitteilung. Über das Carnitin.

Von

Wl. Gulewitsch und R. Krimberg.

(Aus dem medizinisch-chemischen Laboratorium der Universität Moskau.)
(Der Redaktion zugegangen am 3. Juni 1905.)

Bei der Fortsetzung der Untersuchung des Fleischextraktes, welche der eine von uns gemeinschaftlich mit Amiradžibi¹⁾ unternommen und welche zur Entdeckung des Carnosins geführt hatte, richteten wir unsere Aufmerksamkeit auf das Filtrat, welches nach der Ausscheidung des Carnosins in der Form seiner Silberbase zurückbleibt. Indem wir uns der Methode der Fällung mit Kaliumwismuthjodidlösung bedienten, isolierten wir aus diesem Filtrat eine neue Base, für welche wir den Namen Carnitin vorschlagen möchten. Carnitin wurde von uns bei der folgenden Behandlung des Liebigschen Fleischextraktes erhalten.

Eine Lösung von 500 g des Extraktes wurde mit Phosphorwolframsäure gefällt, wie in der ersten Mitteilung (I. c.) beschrieben. Die nach der Zersetzung des Phosphorwolframsäureniederschlages mit Barythydrat erhaltene Flüssigkeit wurde mit Schwefelsäure neutralisiert und darin Silbersulfat²⁾ unter Erwärmen in der Menge aufgelöst, daß eine kleine Probe der Flüssigkeit auf einem Uhrglase mit Barythydrat vermischt keine weiße, sondern eine gelbe, schnell schwarz werdende Fällung

¹⁾ Wl. Gulewitsch u. S. Amiradžibi, Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 565.

²⁾ Dieses Silbersalz wurde angewandt, um die Stickstoffverteilung im Fleischextrakte nach dem Kjeldahlschen Verfahren untersuchen zu können, worüber der eine von uns später berichten wird.

lieferte. Der entstandene Niederschlag wurde abgesaugt und ausgewaschen. Das Filtrat wurde mit einer gesättigten warmen Barythydratlösung ausgefällt, der voluminöse Niederschlag von Carnosinsilber abgesaugt und sorgfältig ausgewaschen. Um auch jenen Teil des Carnosins zu entfernen, welcher in dem neuen, etwa 9 l betragenden Filtrat geblieben war, und um aus der Flüssigkeit das Ammoniak zu vertreiben, welches sich aus den Ammoniumsalzen des Fleischextraktes gebildet hatte und welches, wie man annehmen muß, die Löslichkeit des Carnosinsilbers erhöht, wurde die Flüssigkeit mit Schwefelsäure neutralisiert, mit Schwefelwasserstoff behandelt, filtriert und unter Zusatz von Magnesiumoxyd auf dem Wasserbade zur Sirupdicke eingedampft. Der Sirup wurde mit Wasser verdünnt und die mit Schwefelsäure neutralisierte Flüssigkeit zum zweitenmal mit Silbersulfat und Barythydrat gefällt. Das Filtrat wurde mit Schwefelsäure neutralisiert, mit Schwefelwasserstoff behandelt, auf dem Wasserbade auf etwa 1 l eingengt und mit Kaliumwismuthjodidlösung¹⁾ gefällt.

Der entstandene reichliche orangerote Niederschlag, welcher zuerst flockig ausfiel, verwandelte sich bei weiterer Zufügung des Fällungsmittels in einen harzigen Klumpen. Die Flüssigkeit wurde abgossen, der Niederschlag mit Wasser abgespült und mit frischgefälltem Bleihydroxyd zerrieben. Der blaßgelbe Niederschlag von Bleioxydjodid wurde abgesaugt und gewaschen, das Filtrat mittels Schwefelwasserstoff entbleit. Die erhaltene Flüssigkeit reagierte stark alkalisch. Nach dem Neutralisieren mit Schwefelsäure und dem Einengen auf dem Wasserbade zur Sirupdicke schieden sich Kristalle von Kreatin und Kreatinin ab. Der von denselben abgesaugte Sirup war jedoch nicht zur Kristallisation zu bringen weder unmittelbar, noch mit Wasser verdünnt und mit Alkohol vermischt. Ebenso wenig kristallisierte die Lösung der Base, welche nach dem Entfernen der Schwefelsäure mittelst Barythydrat erhalten wurde. Alsdann wurde diese Lösung mit Salzsäure neutralisiert und auf dem Wasserbade zur Sirupdicke verdampft. Der Sirup wurde in Alkohol gelöst,

¹⁾ Diese Lösung wurde nach K. Kraut bereitet. (Vgl. E. Schmidt, Lehrbuch der pharmaceutischen Chemie, Bd. II, 1901, S. 1368.)

die Lösung eingeengt, der Rückstand mit absolutem Alkohol extrahiert und die alkoholische Lösung mit einer heißen konzentrierten alkoholischen Lösung von Quecksilberchlorid ausgefällt. Der beim Stehen kristallinisch gewordene Niederschlag wurde abgesaugt, mit Alkohol gewaschen und nach dem Trocknen mehrmals mit kochendem Wasser ausgezogen, worin ein Teil ungelöst blieb. Nach dem Erkalten der durch einen Heißwassertrichter filtrierten Extrakte fiel ein geringer Niederschlag aus, welcher abgesaugt wurde. Aus der eingeengten Mutterlauge schied sich ein neuer Niederschlag ab, welcher abgesaugt und ausgewaschen wurde; nach dem Trocknen im Vacuumexsikkator wog derselbe 24 g. Dieser zweite Niederschlag wurde in heißem Wasser gelöst, mit Schwefelwasserstoff zersetzt, das Filtrat vom Quecksilbersulfidniederschlag mit Natriumkarbonat neutralisiert und eingedampft. Der Rückstand wurde mit Alkohol extrahiert, die Lösung eingedampft, der neue Rückstand abermals mit Alkohol ausgezogen und die erhaltene Lösung mit einer alkoholischen Platinchloridchlorwasserstoffsäure ausgefällt. Der entstandene Niederschlag wurde abgesaugt, mit Alkohol gewaschen und getrocknet. Im Wasser, sogar kaltem, erwies er sich als sehr leicht löslich. Nach starkem Einengen der wässerigen Lösung schieden sich einige kleine Kriställchen aus, nachher aber erstarrte die Flüssigkeit zu einer kristallinischen Masse, welche zerrieben, abgesaugt und mit einer kleinen Menge 50%igen Alkohols gewaschen wurde. Das erhaltene helle, orangerote, kristallinische Pulver wurde aus heißem 80%igen (Tr.) Alkohol, in welchem es leicht löslich war, umkristallisiert. Nach dem Erkalten der Lösung schieden sich sehr kleine und kurze Prismen resp. ein kristallinisches Pulver ab. Der Niederschlag wurde abgesaugt, zuerst mit 80%igem, dann mit starkem Alkohol ausgewaschen, bei 115° getrocknet und analysiert. Die Verbindung schmilzt unter starker Zersetzung bei 214—218°; der Schmelzpunkt wechselt mit der Schnelligkeit des Erhitzens.

I. 0,3288 g Substanz, in einem Schiffchen mit gepulvertem Bleichromat bedeckt und in einem mit Bleichromat gefüllten Rohre mit vorgelegter Kupfer- und Silberspirale verbrannt, gaben 0,1287 g H₂O und 0,2771 g CO₂.

II. 0,3635 g Substanz, auf dieselbe Weise verbrannt, lieferten 0,1478 g H_2O und 0,3125 g CO_2 .

III. Aus 0,2379 g Substanz wurden 7,95 ccm N bei 15° und 761 mm Bar. erhalten.

IV. 0,2189 g Substanz hinterließen nach dem Glühen 0,0587 g Pt.

V. 0,2993 g Substanz lieferten 0,0804 g Pt, als PtS_2 ausgeschieden. Aus dem mit Natriumkarbonat eingedampften Filtrate vom Platinsulfidniederschläge resultierten 0,3470 g $AgCl$.

| Gefunden: | | | | | | Berechnet für |
|-----------|--------|--------|-------|--------|--------|------------------------------|
| | I. | II. | III. | IV. | V. | $C_{14}H_{22}N_2O_6Cl_6Pt$: |
| C | 22,98% | 23,45% | — | — | — | 22,96% |
| H | 4,38% | 4,55% | — | — | — | 4,40% |
| N | — | — | 3,90% | — | — | 3,84% |
| Cl | — | — | — | — | 28,66% | 29,06% |
| Pt | — | — | — | 26,82% | 26,86% | 26,62% |
| O | — | — | — | — | — | 13,12% |

Die Ergebnisse der Analysen zeigen somit, daß die am Schlusse der oben beschriebenen komplizierten Behandlung des Fleischextraktes isolierte Substanz die Zusammensetzung $C_{14}H_{22}N_2O_6Cl_6Pt$ hat und folglich das Choroplatinat einer noch unbekannten Base darstellt, für welche wir den Namen Carnitin vorschlagen. In der Voraussetzung, daß diese Substanz ein Monoamin und kein Diamin ist und daß hier keine quartäre Ammoniumbase vorliegt, kann die Zusammensetzung des Carnitins durch die Formel $C_7H_{13}NO_3$ ausgedrückt werden.

Die freie Base reagiert stark alkalisch und ist, wie auch ihr salzsaures und salpetersaures Salz, im Wasser äußerst leicht löslich. Das salpetersaure Salz wurde aus seiner wässerigen und alkoholischen Lösung kristallinisch erhalten, nämlich in der Form von strahligen Drusen nadelförmiger Kriställchen. Das salpetersaure Salz dreht die Polarisationssebene des Lichtstrahles nach links.¹⁾

Die lange Reihe der Extraktivstoffe des Muskelgewebes hat sich jetzt somit noch um ein neues Glied bereichert. Das Carnitin, der neu entdeckte stickstoffhaltige Bestandteil des

¹⁾ $[\alpha]_D$ kann ungefähr auf -22° geschätzt werden. Exakte Bestimmungen desselben konnten wegen der geringen Menge der Substanz nicht ausgeführt werden.

Fleischextraktes, unterscheidet sich von den übrigen Extraktivstoffen des Muskelgewebes dadurch, daß im Carnitin auf 1 Atom Stickstoff 3 Atome Sauerstoff kommen. Seinen stark alkalischen Eigenschaften nach kann das Carnitin nicht eine Oxyaminosäure sein und seiner chemischen Struktur nach nimmt es möglicherweise eine besondere Stellung unter den übrigen bekannten Bestandteilen des tierischen Organismus ein.

Die Untersuchung der Verbindungen von Carnitin wird von einem von uns fortgesetzt und auch die Versuche zur Aufklärung der chemischen Konstitution dieses Körpers werden in Angriff genommen werden.

Am Schluß möchten wir darauf hinweisen, daß die bei den zoochemischen Untersuchungen wenig Anwendung findende Methode der Ausfällung mit Kaliumwismuthjodidlösung in vielen Fällen erhebliche Dienste leisten kann, so z. B. in der Gegenwart von Kaliumsalzen, welche bekanntlich, gleich den Salzen der organischen Basen, sowohl durch Phosphorwolframsäure, wie auch durch Pikrinsäure gefällt werden. Auch die Möglichkeit der Ausscheidung der organischen Basen aus den Niederschlägen, welche bei der Einwirkung einer Kaliumwismuthjodidlösung entstehen, durch Zerreiben dieser Niederschläge bei der gewöhnlichen Temperatur mit Bleihydroxyd, wie oben gezeigt, womit die Gefahr der Zersetzung der Basen vermieden wird, gehört zu den nicht unbedeutenden Vorteilen dieser Methode.

Über die Malzoxydase.

Von

W. Issajew.

(Mittellung aus dem Laboratorium für Technologie der Kohlehydrate des Polytechnischen Instituts zu Warschau.)

(Der Redaktion zugegangen am 6. Juni 1905.)

Man findet in der Literatur nur vereinzelte Angaben, aus welchen das Vorhandensein eines Oxydationsenzym im Malze sich vermuten läßt. So war es schon lange bekannt, daß fast alle Pflanzen und Tierorgane die Eigenschaft besitzen, das Wasserstoffsuperoxyd zu katalysieren; man benutzt, um diese Zersetzung zum Vorschein zu bringen, die bekannte Guajacreaktion. Die Fähigkeit der Malzauszüge, diese Reaktion zu geben, wurde zuerst, wie es scheint, von van den Broek¹⁾ bemerkt. Die Reaktion ist so empfindlich, daß Schönbein²⁾ empfahl, mittels Malzauszuges die Spuren von H_2O_2 , z. B. im Wasser nachzuweisen. Er weist ausdrücklich darauf hin, daß die Substanzen, welche das Wasserstoffsuperoxyd katalysieren und im Pflanzen- und Tierreich sehr verbreitet sind, nicht organisiert sind und zur Klasse der fermentartigen Substanzen gehören. Infolgedessen ist die Guajacreaktion eine spezifische Enzymreaktion und man benutzte dieselbe zum Nachweis der Enzyme überhaupt.³⁾ Jetzt aber wissen wir, daß die Erscheinung viel komplizierter ist: die Guajacreaktion ist keine allgemeine Enzymreaktion, sondern eine Oxydasenreaktion. Dabei sind verschiedene Fälle zu unterscheiden: Zuweilen tritt die Bläuung der Tinktur ohne Zusatz von H_2O_2 ein, in anderen Fällen ist der letztere nötig; die Zersetzung des Wasserstoffsuperoxyds kann auch durch be-

¹⁾ Jahresber. von Liebig u. Kopp, 1849, S. 455; 1850, S. 515.

²⁾ Zeitschrift f. Biologie, 1868, S. 367.

³⁾ Oppenheimer, Die Fermente, S. 44; Effront, Les Enzymes, S. 27.

sondere Enzyme, Katalasen, bewirkt werden, dabei wird der Sauerstoff nicht aktiviert. Man unterscheidet somit drei Enzymklassen dieser Kategorie: Oxydasen, Peroxydasen und Katalasen.

Die Eigenschaft des Malzauszuges, Oxydationen hervorzubringen, wurde von Struve¹⁾ beobachtet. Versetzt man eine Pyrogallollösung mit Gummiarabicumlösung oder Malzauszug, so scheiden sich nach einiger Zeit Kristalle von Purpurogallin ab. Struve erklärt diese Eigenschaft des Malzauszugs durch dessen Gehalt an Gummi; wir wissen aber jetzt, daß auch im Gummiarabicum sich eine Oxydase befindet. Lepine²⁾ hat bei seinen Studien über die Glykolyse gefunden, daß die Malzdiastase durch Behandlung mit verdünnter Schwefelsäure in das glykolytische Enzym verwandelt werden kann. Es handelte sich gewiß um die der Diastase stets beigemischte Oxydase; dieselbe wird durch Schwefelsäure abgeschwächt oder ganz vernichtet.

Grüss³⁾ studierte die Frage näher. Er benutzte bei seinen Untersuchungen das «Tetrapapier» d. h. Papierstreifen mit Tetramethylparaphenylendiaminlösung getränkt. Legt man auf das angefeuchtete Tetrapapier ein zerschnittenes Gerstenkorn, so färbt sich letzteres in Berührung mit Luft violett. Erhöhte Temperatur und Alkohol verhindern das Auftreten der Reaktion. Bei der Keimung tritt die Reaktion zuerst stärker, dann aber schwächer hervor. Grüss schreibt diese Reaktion einem Oxydationsenzym, der Spermase zu. Er machte aber keine Versuche zur Isolierung des Enzyms.

1. Untersuchungsmethoden.

Ich führte meine Versuche ausschließlich mit Auszügen aus Gerste, Malz und Mercks Diastase aus. Man kann zur Extraktion mit fast dem gleichen Erfolg Wasser, wässriges Glycerin oder 20%igen Alkohol anwenden. Am bequemsten benutzt man 50%iges Glycerin, weil dadurch die Sterilisation der Auszüge mittels Bakterienfilter entbehrlich wird. In meinem Laboratorium befinden sich mehr als ein Jahr alte

¹⁾ Liebigs Ann., Bd. CLXIII, S. 160.

²⁾ Comptes rendus, Bd. CXX, S. 139.

³⁾ Wochenschrift für Brauerei 1899, S. 522.

Glycerinauszüge, welche vollkommen klar, infektionsfrei und oxydasereich bleiben. Die Glycerinauszüge aber filtrieren infolge ihrer Zähigkeit ziemlich langsam und durch Wasser wird jedenfalls mehr Oxydase extrahiert. Man kann deswegen auch folgendermaßen verfahren. Das Malz wird mit chloroform-gesättigtem Wasser 48 Stunden extrahiert, filtriert und das Filtrat mit dem gleichen Volumen absoluten Glycerins versetzt. Die Anwendung der Glycerinauszüge bietet noch den großen Vorteil, daß man sich größere Mengen davon vorbereiten und also mehrere Versuche mit gleichmäßigem Material ausführen kann.

Die zu untersuchenden Substanzen wurden auch in 50%igem Glycerin gelöst und zwar in solcher Quantität, daß ihre schließliche Konzentration nach dem Zusatz der Enzymlösung 1%ig war; im Falle einer geringen Löslichkeit wurden die Substanzen in entsprechender Quantität als solche zugesetzt.

Die Oxydation mit Luft wurde unter fortwährendem Schütteln und bei erhöhter Temperatur (38°) ausgeführt. Dazu benutzte ich die in dieser Zeitschrift¹⁾ beschriebene Vorrichtung. Die Flaschen waren von dunklem Glase und die Versuche wurden hauptsächlich während der Nacht ausgeführt, um die Wirkung des Lichtes, welche speziell untersucht werden soll, zu eliminieren. Die Versuche dauerten gewöhnlich 16—18 Stunden. Vergleichbar sind gewiß nur die Versuche eines und desselben Tages. Ich führe die Beschreibung eines Versuchs an, um die Anordnung und Berechnung der Versuche an einem Beispiel zu erläutern, in der Folge werde ich nur die Resultate angeben.

50 ccm 1½%iger Pyrogallollösung in 50%igem Glycerin wurden mit 30 ccm Auszug aus lufttrockenem Malz versetzt. Volumen der Reaktionsflasche: 505 ccm. Anfang des Versuchs 2 Uhr nachmittags, Druck 760,9 mm, Temperatur 18,7°. Schluß des Versuchs 8 Uhr früh, Druck 757,7 mm, Temperatur 18,5°. Unterschied der Quecksilberhöhen in beiden Schenkeln des Manometers — 30 mm.

Zur Analyse wurden 40,55 ccm Gas genommen; gefunden: Kohlensäure — 0,9 ccm = 2,21%, Sauerstoff — 5,85 ccm = 14,42%.

¹⁾ Bd. XLII, S. 135 (1904).

Anfangsvolumen der Luft in der Flasche bei 0° und 760 mm 396,5 ccm, Sauerstoff 82,9 ccm. Volumen der Luft nach der Reaktion 376,8 ccm, Sauerstoff 54,3 ccm, Kohlensäure 8,3 ccm.

Es wurden also 28,6 ccm Sauerstoff absorbiert und 8,3 ccm Kohlensäure entwickelt. Die Farbe der Flüssigkeit war dunkelbraun, undurchsichtig.

Die Auszüge, welche zur Ausführung der unten beschriebenen Versuche dienten, wurden größtenteils aus lufttrockenem Malz durch Extraktion mit 4 Teilen 50%igen Glycerins bei 25° im Thermostaten zubereitet. Nach 48 Stunden wurden sie filtriert, neutralisiert und 18 Stunden lang in meinem «beweglichen Thermostaten» geschüttelt, um den größten Teil der «reduzierenden Körper» wegzuoxydieren. Die Flüssigkeit färbt sich dabei dunkel und es scheidet sich ein flockiger Niederschlag aus. 100 ccm Malzauszug absorbieren dabei etwa 4 ccm Sauerstoff und entwickeln etwa 2 ccm Kohlensäure. Die oxydierte Flüssigkeit wurde mittels Kieselgur klar filtriert und zu den Hauptversuchen verwendet.

2. Qualitative Reaktionen.

Für qualitative Reaktionen benutzte ich Guajactinktur, «Tetrareagens» — Tetramethylparaphenylendiaminchlorhydratlösung und alkoholische Guajacollösung. Die Gersten- und Malzauszüge verhalten sich gegen diese Reagentien durchaus gleich.

Mit frisch bereiteter Guajactinktur und mit Guajacol bekommt man keine Färbung; mit Tetralösung eine schwache violette Färbung; setzt man aber ein paar Tropfen schwachen Wasserstoffsuperoxyds hinzu, so tritt sofort eine intensiv blaue Färbung mit Guajac, eine braune mit Guajacol und eine violette mit Tetrareagens ein; zugleich wird eine starke Wasserstoffsuperoxydkatalyse beobachtet, was auf die Anwesenheit einer Katalase hindeutet. Mit einen Tag alter Guajactinktur bekommt man auch ohne H_2O_2 eine schwache grüne Färbung.

Man sollte auf Grund dieser qualitativen Reaktionen die Malzoxydase in die Klasse der sogenannten «indirekten» Oxydasen,

β -Oxydasen, Peroxydasen¹⁾ einreihen, aber wir werden weiter sehen, daß Malzauszüge auch direkte Oxydationen verschiedener Substanzen beschleunigen. Wir haben wahrscheinlich in Malzauszügen beide Arten von Oxydasen und außerdem noch eine Katalase.

Die Auszüge, 10—15 Minuten im Wasserbade erwärmt, geben keine Farbreaktionen, obgleich ihre oxydativen Eigenschaften auch bei höherer Temperatur nicht vernichtet werden, wenigstens in Glycerinlösungen.

Läßt man den Malzauszug in offenem Reagenscylinder einige Tage stehen, so färbt sich die Flüssigkeit dunkel, indem diese Färbung sich allmählich von oben nach unten verbreitet. Sie deutet auf die Anwesenheit leicht oxydierbarer Substanzen, deren Natur uns vorläufig unbekannt ist; wir können sie nach Grüss' Vorschläge unter dem Namen «reduzierende Körper» zusammenfassen.

3. Einfluß der Konstitution autoxydabler Substanzen.

Um die untersuchte Oxydase näher zu charakterisieren, prüfte ich eine Reihe von Substanzen in bezug auf ihre Oxydierbarkeit durch Luft in Gegenwart von Malzauszug. Dabei zeigte sich, wie dies von Bertrand²⁾ bei Laccase gefunden wurde, daß die Malzoxydase sehr spezifisch wirkt und der Laccase ähnlich ist.

Unter den vielen von mir geprüften Stoffen wurden folgende gar nicht oder ziemlich schwach oxydiert: Phenol, Kresole, m-Xylenol, Carvacrol, Guajacol, Orcin, Gallussäure, Gerbsäure, Vanillin, Acetaldehyd, Butylaldehyd, Benzaldehyd, Salicylaldehyd,³⁾ Terpinhydrat, Terpeneol, Glykokoll, Asparagin, Tyrosin, Leucin, Glukose, Fruktose, Maltose, Chinon, Glutaminsäure, Caffein, Morphin, Anilin, Benzoylphenylhydrazin, Dimethylhydrochinon, Dimethylresorcin, Ameisensäure, Milchsäure und arsenige Säure (Kaliumsalze).

¹⁾ Oppenheimer, Die Fermente, S. 349, 350 u. 369.

²⁾ Comptes rendus, Bd. CXXII, S. 1132.

³⁾ Um die Säuren abzustumpfen, wurde bei Aldehyden CaCO_3 zugesetzt.

Folgende Substanzen dagegen oxydierten sich merklich und zum Teil ziemlich stark: p-Amidophenol, Brenzkatechin, Resorcin, Hydrochinon, Pyrogallol, Phloroglucin, Oxyhydrochinon, gallussaures Kalium.

Die Versuche wurden folgenderweise angestellt.

1. 50 ccm 1 $\frac{1}{2}$ %iger Lösung des untersuchten Körpers
+ 25 ccm Malzauszug.

2. 50 ccm 1 $\frac{1}{2}$ %iger Lösung des untersuchten Körpers
+ 25 ccm Glycerin (50%).

3. 50 ccm 50%igen Glycerins + 25 ccm Malzauszug.

Täglich wurde nur ein Körper untersucht; da aber alle Versuche mit demselben Malzauszug und bei annähernd gleichen Bedingungen ausgeführt wurden, so sind die Versuche verschiedener Tage bis zu gewissem Grade unter sich vergleichbar.

Die Resultate sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

| Untersuchter Stoff | Ab-sorbierter O
in ccm | | | Ent-wickelte
CO ₂
in ccm | | | Farbe der Lösung | |
|---------------------|---------------------------|------|-----|---|-----|---|--------------------|-------------|
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 |
| p-Amidophenol . . | 35,4 | 29,5 | 2,0 | — | — | — | dunkelbraun, Nied. | do. |
| Brenzkatechin . . | 6,8 | 1,8 | 0,9 | — | — | — | dunkelrot | hellrot |
| Resorcin | 3,5 | 1,9 | 1,0 | — | — | — | fast unverändert | |
| Hydrochinon . . . | 4,2 | 2,0 | 1,5 | — | — | — | rosa | unverändert |
| Pyrogallol | 15,6 | 2,7 | 2,5 | 2,6 | — | — | dunkelbraun | gelb |
| Phloroglucin . . . | 4,1 | 0,4 | 1,4 | — | — | — | unverändert | |
| Oxyhydrochinon . | 48,7 | 17,0 | 1,3 | 5,9 | — | — | dunkelbraun | rot |
| Gallussaures Kalium | 62,0 | 28,2 | 1,8 | 32,0 | 5,6 | — | " | braun |
| Gallussäure . . . | 2,4 | 1,6 | 1,4 | — | — | — | unverändert | |

Es folgt aus den oben angeführten negativen Versuchen und aus dieser Tabelle, daß nur Körper von ganz bestimmtem Charakter und Konstitution durch die Malzoxydase oxydiert werden. Sie alle sind autoxydabel, d. h. mehr oder weniger leicht an der Luft oxydierbar, und diese Autoxydation wird durch die Malzoxydase nur beschleunigt; diese Beschleunigung

ist verschieden stark, je nach der Konstitution der Stoffe. Sie gehören fast alle zu den Polyphenolen; p-Amidophenol oxydiert sich leichter als Hydrochinon, so daß die Amidgruppe die Oxydierbarkeit der Benzolderivate erhöht; im Gegensatz dazu erniedrigt die Methylgruppe dieselbe, was aus dem Beispiel des Orcins folgt. Je mehr Hydroxyle vorhanden sind, desto energischer werden die Phenole oxydiert. Gallussäure wird am stärksten oxydiert, aber nur in Gestalt von Salz, freie Säure wird nicht oxydiert. Aus den Stellungisomeren werden, wie es scheint, am stärksten Orthoverbindungen oxydiert, dann die Para-, am schwächsten die Meta-. Bertrand fand für die Laccase etwas abweichende Anordnung: para, ortho, meta. Es muß allerdings bemerkt werden, daß die Malzoxydase bei einiger Ähnlichkeit der Laccase auch wesentlich abweichende Eigenschaften besitzt. Die von mir erhaltenen Oxydationseffekte sind viel schwächer als die von Bertrand beobachteten, besonders bei Hydrochinon; dies kann allerdings durch einen geringeren Gehalt an Enzym erklärt werden, obgleich wir gleichzeitig mit einer schwachen Oxydation des Hydrochinons eine starke Oxydation des Pyrogallols, dann des Brenzkatechins beobachteten. Viel wichtiger ist die Empfindlichkeit der Malzoxydase gegen saure Reaktion: Gallussäure wird von derselben gar nicht oxydiert, von der Laccase dagegen sehr energisch. Wir werden weiter den Unterschied im Verhalten gegen Mangansalze sehen.

Es muß bemerkt werden, daß der Ersatz des Wasserstoffs der Hydroxyle durch Methylgruppen die Oxydierbarkeit aufhebt (Dimethylhydrochinon, Dimethylresorcin). Charakteristisch ist auch das negative Verhalten gegen Tyrosin — die Malzoxydase ist also von der Tyrosinase Bertrands¹⁾ verschieden. Gegen Guajacol verhält sich dieselbe auch indifferent, nach dem Zusatz von H_2O_2 tritt, wie wir oben gesehen haben, eine Oxydation ein.

Die Produkte der Oxydation bedürfen noch der Erforschung. Was z. B. Pyrogallol betrifft, so beobachtete ich niemals charakteristische rote Kristalle von Purpurogallin; führt man aber die Reaktion in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd aus, so scheidet sich sofort Purpurogallin ab. Es ist möglich, daß in

¹⁾ Comptes rendus Bd. CXXII, S. 1215; Bd. CXXIII, S. 463.

beiden Fällen die Reaktion nach verschiedenen Richtungen verläuft.

4. Einfluß der Temperatur.

Wir haben oben gesehen, daß 10 bis 15 Minuten Erwärmung bei 100° genügen, um gewisse qualitative Farbreaktionen zu vernichten. Es ist aber viel schwieriger, die oxydativen Eigenschaften der Auszüge zum Verschwinden zu bringen. Vielleicht erklärt sich diese Stabilität der Oxydase damit, daß ich mit konzentrierten Glycerinlösungen arbeitete; bekanntlich erhöht die Abwesenheit von Wasser die Stabilität der Enzyme.

Gleiche Quantitäten des Malzauszuges wurden erwärmt: 1. 30 Minuten im siedenden Wasserbad. 2. 1 Stunde im Wasserbad. 3. 30 Minuten im Autoklaven bei 1½ Atmosphäre. Nach dem Erkalten wurde das verdampfte Wasser ersetzt und die abgeschiedenen Niederschläge abfiltriert. Zum Kontrollversuch wurde der unveränderte Malzauszug genommen. Je 25 ccm Auszugs wurden zu 50 ccm 1½%iger Pyrogallollösung in 50%igem Glycerin¹⁾ zugesetzt.

| | 1 | 2 | 3 | Kontroll-
versuch |
|-------------------------------------|-----------|-----------|------|----------------------|
| Absorbierter O in ccm . . | 10,1 | 10,3 | 6,6 | 33,3 |
| Entwickelte CO ₂ | 2,0 | 1,8 | — | 9,9 |
| Farbe der Flüssigkeit . . | hellbraun | hellbraun | gelb | dunkelbraun |

Wir sehen, daß erhöhte Temperatur die oxydative Wirkung bedeutend vermindert, aber auch ½ stündiges Erhitzen bei 1½ Atmosphäre dieselbe nicht vollkommen vernichtet.

Wird Grünmalz einer höheren Temperatur ausgesetzt, so tritt auch bedeutende Abschwächung des Enzyms ein (siehe weiter unten).

Es soll bei weiteren Versuchen untersucht werden, ob

¹⁾ Alle unten beschriebenen Versuche wurden mit Pyrogallol ausgeführt.

wir hier nicht mit verschiedenartigen Substanzen zu tun haben, von welchen einige, welche einfacherer Natur sind, hohen Temperaturen widerstehen und auch die Autoxydation beschleunigen.

5. Einfluß der Säuren und Alkalien.

Setzt man bei der Malzextraktion 0,1% von Schwefelsäure hinzu, so bekommt man Auszüge, die nach der Neutralisation der Säure keine qualitativen Reaktionen geben. Nimmt man statt Schwefelsäure Soda, so bleiben die Farbreaktionen erhalten. Man könnte vermuten, daß die Malzoxydase besonders gegen Säuren empfindlich ist. Dies wird durch quantitative Versuche bestätigt; bei kurzer Säureeinwirkung wird die Oxydase nicht vernichtet, sondern nur gebunden, denn nach der Neutralisation erlangt die oxydasische Wirkung ihre ursprüngliche Stärke.

1. 50 ccm Malzauszugs wurden mit 2 ccm n_{10} -H₂SO₄ versetzt und nach 30 Minuten mit NaOH neutralisiert.

2. 50 ccm Malzauszugs wurden mit entsprechender Menge Na₂SO₄ versetzt.

Je 25 ccm dieser Auszüge wurden mit 50 ccm 1 $\frac{1}{2}$ %iger Pyrogallollösung vermischt.

| | 1 | 2 |
|---------------------------------------|------|------|
| Absorbierter O | 30,5 | 30,8 |
| Entwickelte CO ₂ | 9,8 | 9,1 |

Die n_{200} -Schwefelsäure zerstört also die Oxydase nicht.

1. Malzauszug in n_{20} -NaCl.

2. Malzauszug 1 Stunde mit n_{104} -HCl behandelt.

3. Malzauszug 1 Stunde mit n_{52} -HCl behandelt.

4. Malzauszug 1 Stunde mit n_{26} -HCl behandelt.

In 2 und 3 bildet sich nach dem Säurezusatz eine Trübung, die nach der Neutralisation verschwindet; in 4 entsteht dagegen die Trübung erst nach der Neutralisation; sie wurde abfiltriert.

| | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---------------------------------------|------|------|------|------|
| Absorbierter O | 38,2 | 37,0 | 36,8 | 34,7 |
| Entwickelte CO ₂ | 12,6 | 12,2 | 12,0 | 11,1 |

Wir sehen, daß die Zerstörung der Oxydase allmählich eintritt und erst bei $n/56$ -HCl merklich wird. Läßt man aber die Säure nicht neutralisiert, so ist die Wirkung der Oxydase paralysiert.

1. Der Malzauszug wurde 2 Stunden mit $n/54$ -HCl behandelt, der gebildete Niederschlag abfiltriert.

2. Salzsäure war $1/11$ normal; es bildete sich kein Niederschlag.

3. Salzsäure war $1/51$ normal; nach 2 Stunden wurde der Niederschlag abfiltriert und die Säure neutralisiert.

4. Kontrollversuch mit dem ursprünglichen Malzauszug.

| | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---------------------------------------|----------|----------|-------------|-------------|
| Absorbierter O | 1,5 | 2,1 | 26,9 | 32,2 |
| Entwickelte CO ₂ | — | — | 8,0 | 10,6 |
| Farbe der Flüssigkeit | hellgelb | hellgelb | dunkelbraun | dunkelbraun |

Prüft man die Enzymlösung 2 mit Guajak tinktur und H₂O₂ vor der Neutralisation der Säure, so bekommt man keine Färbung, nach der Neutralisation tritt eine blaue Färbung ein, die etwas schwächer ist als sonst.

In ähnlicher Weise wurde die Wirkung der Alkalien untersucht.

1. Der Malzauszug wurde $1\frac{1}{2}$ Stunden mit $n/51$ -NaOH behandelt, dann neutralisiert.

2. Kontrollversuch.

| | 1 | 2 |
|---------------------------------------|-----|-----|
| Absorbierter O | 7,4 | 8,3 |
| Entwickelte CO ₂ | 2,1 | 1,4 |

Die n_{51} -Natronlauge ist also ohne Wirkung auf die Malzoxydase; qualitative Reaktionen werden auch nach 24 stündiger Behandlung des Auszuges mit n_{51} -NaOH beobachtet.

1. 50 ccm Pyrogallollösung in $0,0015/n$ -NaOH + 25 ccm Malzauszuges (die Konzentration von NaOH also n_{1000}).

2. Statt des Auszuges wurden 25 ccm 50%igen Glycerins zugesetzt.

3. Pyrogallollösung ohne NaOH + 25 ccm Auszuges.

4. 50 ccm 50%igen Glycerins in $0,0015/n$ -NaOH + 25 ccm Auszuges.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | Summa von
2, 3 u. 4 |
|-----------------------------|------|-----|------|-----|------------------------|
| Absorbierter O . | 26,9 | 7,9 | 16,9 | 3,2 | 28,0 |
| Entwickelte CO ₂ | 8,1 | 1,4 | 4,7 | — | 6,1 |

Man sieht, daß die n_{1000} -Natronlauge keine wesentliche Wirkung auf die Oxydase ausübt. Ähnliche Resultate wurden mit konzentrierterer Lauge erhalten.

1. Pyrogallollösung in n_{400} -KOH mit Malzauszug (die schließliche Konzentration der Kalilauge n_{600}).

2. Statt des Auszuges wurde 50%iges Glycerin zugesetzt.

3. Pyrogallollösung ohne KOH mit dem Malzauszug.

4. Statt der Pyrogallollösung wurde 50%iges Glycerin in n_{400} -KOH mit dem Malzauszug genommen.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | Summa
von 2, 3 und 4 |
|-----------------------------|------|------|------|-----|-------------------------|
| Absorbierter O | 38,1 | 12,7 | 23,9 | 3,1 | 39,7 |
| Entwickelte CO ₂ | 12,7 | 3,2 | 5,4 | — | 8,6 |

Wir sehen hier, ebenso wie bei NaOH, einen merklichen Unterschied in bezug auf den Kohlensäuregehalt; vielleicht geht die Oxydation in Gegenwart von Lauge etwas anders, die Sauerstoffabsorption bleibt jedenfalls die ursprüngliche. Weiter mit der Konzentration der Lauge hinaufzugehen, schien nicht ratsam, weil schon bei unseren Konzentrationen eine merkliche Oxydation des Pyrogallols allein stattfindet.

Man konnte vermuten, daß bei der Extraktion des Malzes mit schwachen Alkalien mehr Oxydase in die Lösung übergeht, wie dies z. B. bei den Katalasen der Fall ist. Diese Vermutung wurde jedoch durch Versuche nicht bestätigt.

4 Portionen luftgetrockneten Malzes wurden 24 Stunden extrahiert mit 100 ccm: 1. Chloroformwasser, 2. $n/100$ -Kalilauge, 3. $n/50$ -Kalilauge und 4. $n/25$ -Kalilauge. Die Auszüge wurden nach der Filtration neutralisiert, mit gleichem Volumen wasserfreien Glycerins versetzt, mit Luft in gewöhnlicher Weise behandelt und wieder filtriert. 25 ccm jeden Auszuges wurden mit 50 ccm Pyrogallollösung vermischt.

| | 1 | 2 | 3 | 4 |
|-------------------------------|------|------|------|------|
| Absorbierter O . | 24,2 | 19,1 | 21,8 | 22,6 |
| Entwickelte CO ₂ . | 3,8 | 3,2 | 5,9 | 6,2 |

Alkalische Extraktionsmittel ziehen also eher weniger Oxydase aus. Aus allen oben angeführten Versuchen folgt, daß die Malzoxydase am besten in neutralem Medium funktioniert. Unsere Auszüge sind freilich immer sauer wegen der Anwesenheit von Phosphaten, aber dies bedeutet keinesfalls, daß die Oxydase auch in Samenzellen bei saurer Reaktion funktionieren soll. In dieser Hinsicht sind die Versuche von Boidin und Moussin¹⁾ interessant: sie zeigen, daß die Getreidesamen eher alkalisch als sauer sind.

6. Einfluß auf die Reaktion fremder Substanzen.

Die Malzoxydase wird von der Knochenkohle, wenigstens bei gewöhnlicher Temperatur, nur teilweise absorbiert.

Der Malzauszug wurde 15 Minuten mit Knochenkohle behandelt und dann mittels Kieselgur abfiltriert. Vom Filtrate wurden 35 ccm 30 Minuten in kochendem Wasserbade gleichzeitig mit 35 ccm ursprünglichen Auszuges erwärmt; das verdampfte Wasser wurde ersetzt und die Niederschläge abfiltriert.

¹⁾ Bull. de l'Assoc. de chimistes de distill., Oktober 1904.

Je 25 ccm des so behandelten Auszuges wurden mit 50 ccm Pyrogallollösung vermischt.

1. Der Auszug ohne Knochenkohle und unerwärmt; 2. der Auszug erwärmt; 3. der Auszug mit Knochenkohle behandelt, unerwärmt; 4. der Auszug ebenso behandelt und erwärmt.

| | 1 | 2 | 3 | 4 |
|-------------------------------|------|------|------|-----|
| Absorbierter O . | 27,2 | 11,1 | 18,0 | 8,7 |
| Entwickelte CO ₂ . | 9,0 | 1,8 | 5,0 | 2,8 |

HgCl₂ vernichtet die Oxydase vollständig; dieselbe wird wahrscheinlich mit dem nach HgCl₂-Zusatz sich bildenden Niederschlag mitgerissen.

1. Kontrollversuch (ohne HgCl₂); 2. Gehalt an HgCl₂ etwa 0,13%; 3. 50%iges Glycerin mit Auszug und HgCl₂; 4. Pyrogallollösung mit HgCl₂ ohne Auszug.

| | 1 | 2 | 3 | 4 |
|-------------------------------|------|-----|-----|-----|
| Absorbierter O . | 22,2 | 1,7 | 2,0 | 0,9 |
| Entwickelte CO ₂ . | 7,8 | — | — | — |

Gerbsäure schlägt die Malzoxydase auch nieder; das ist wahrscheinlich die Ursache, warum sie vom Malzauszug nicht oxydiert wird (siehe S. 335).

Alkohol bei nicht zu großer Konzentration wirkt auf die Reaktion günstig ein.

Es wurden folgende Versuche angestellt: 1. in 50%igem Glycerin wie gewöhnlich; 2. in 20%igem Alkohol und 3. in 40%igem Alkohol.

| | 1 | 2 | 3 |
|---------------------------------|------|------|------|
| Absorbierter O . . | 20,9 | 35,6 | 14,9 |
| Entwickelte CO ₂ . . | 5,6 | 12,2 | 2,8 |

Man sieht, daß in 20%igem Alkohol die Reaktion viel

energischer verläuft als in Glycerin, es bildet sich ein reichlicher Niederschlag; aber schon 40%iger Alkohol schwächt die Oxydase bedeutend ab.

Ich versuchte das Glycerin bei der Malzextraktion durch Alkohol verschiedener Konzentration oder durch Wasser zu ersetzen.

3 Portionen des Malzes zu je 50 g wurden extrahiert: 1. mit 200 ccm 50%igen Glycerins; 2. mit 200 ccm 20%igen Alkohols; 3. mit 200 ccm Chloroformwasser. Nach 48 Stunden wurden die Auszüge abfiltriert und versetzt: 1. mit gleichem Volumen von 50%igem Glycerin; 2. von wasserfreiem Glycerin und 3. von 20%igem Alkohol. Die Auszüge wurden neutralisiert und mit Luft behandelt. Die Versuche wurden in gewöhnlicher Weise angestellt. Mit dem Auszuge 3 wurde noch ein Versuch 4 ausgeführt: mit Pyrogallol, nicht in Glycerin, sondern in 20%igem Alkohol gelöst.

| | 1 | 2 | 3 | 4 |
|-------------------------------|------|------|------|------|
| Absorbierter O . | 27,8 | 32,5 | 22,2 | 45,1 |
| Entwickelte CO ₂ . | 7,9 | 9,8 | 5,6 | 15,5 |

In den Flaschen 2 und 4 bildete sich ein ziemlich reichlicher Niederschlag. Am besten wirkt also alkoholischer Auszug, besonders in alkoholischer Lösung. 4 Malzportionen zu je 50 g wurden extrahiert: 1. mit 150 ccm Chloroformwasser, 2. mit 150 ccm 50%igen Glycerins, 3. mit 150 ccm 20%igen Alkohols und 4. mit 150 ccm 50%igen Alkohols. Nach 48 Stunden wurden die Auszüge abgesaugt, mit gleichen Volumina entsprechender Flüssigkeiten versetzt und mit Luft behandelt (ohne vorherige Neutralisation).

| | 1 | 2 | 3 | 4 |
|-------------------------------|-------|-----------|-----------|------------|
| Absorbierter O . | 12,9 | 5,6 | 4,4 | 3,2 |
| Entwickelte CO ₂ . | 2,9 | 0,8 | 0,8 | — |
| Farbe | braun | hellbraun | hellbraun | dunkelgelb |

Dieselben Auszüge wurden dann neutralisiert.

| | 1 | 2 | 3 | 4 |
|-------------------------------|-------------|--------------|--------------|-------|
| Absorbierter O . | 28,6 | 19,8 | 24,0 | 11,8 |
| Entwickelte CO ₂ . | 8,3 | 4,9 | 5,4 | 1,9 |
| Farbe | dunkelbraun | heller als 1 | heller als 1 | braun |

Aus diesen Versuchen folgt, wie wesentlich die Neutralisation der Auszüge ist; wir sehen weiter, daß auch 50%iger Alkohol die Oxydase extrahiert. Es muß noch bemerkt werden, daß Pyrogallol in Glycerinlösung angewandt wurden. Die qualitativen Reaktionen gelangen mit dem Auszuge 4 schwach, mit Guajacol zeigte sich sogar keine Reaktion.

Sehr charakteristisch und unerwartet war die Wirkung der Mangansalze (vorläufig habe ich nur Mangansulfat geprüft). Man setzt oft, wie bekannt, die oxydativen Eigenschaften der Pflanzenextrakte in Abhängigkeit von deren Gehalt an Mangansalzen. Bertrand¹⁾ zeigte durch direkte Versuche, daß Laccasepräparate mit geringem Mangangehalt die Polyphenole schwach oxydieren, ihre Wirkung aber durch Zusatz minimaler Mengen von Mangansulfat bedeutend verstärkt werden kann. Ich stellte Versuche mit zwei verschiedenen Konzentrationen von Mangansulfat an: einerseits mit sehr geringen, etwa den von Bertrand angewandten gleichen, anderseits mit viel stärkeren. Man bekommt aber in beiden Fällen Resultate, die von den Angaben Bertrands abweichen.

1. 50 ccm Pyrogallollösung + 25 ccm Malzauszuges;
 2. 50 ccm Pyrogallollösung + 25 ccm Malzauszuges, mit Zusatz von MnSO₄, sodaß der Mn-Gehalt 300 mg pro 100 ccm der Versuchsflüssigkeit betrug; 3. 50 ccm Pyrogallollösung mit MnSO₄ und 25 ccm Glycerins statt des Malzauszuges; 4. 50 ccm Glycerins statt der Pyrogallollösung mit MnSO₄ und 25 ccm des Malzauszuges.

¹⁾ Comptes rendus, Bd. CXXIV, S. 1032, 1355.

| | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---------------------------------------|------|-----|-----|-----|
| Absorbierter O | 26,7 | 7,4 | 4,4 | 1,5 |
| Entwickelte CO ₂ | 9,9 | 2,2 | 0,9 | — |

Die zweite Versuchsreihe wurde mit viel geringerem Gehalt an Mangan, nämlich 4 mg pro 100 ccm Versuchsflüssigkeit ausgeführt.

| | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---------------------------------------|------|------|-----|-----|
| Absorbierter O | 27,7 | 26,5 | 2,3 | 3,1 |
| Entwickelte CO ₂ | 8,9 | 8,8 | — | — |

Aus diesen Versuchreihen folgt, daß schwache Mangankonzentrationen keinen wesentlichen Einfluß auf den Oxydationseffekt der Oxydase ausüben, die stärkeren dieselben bedeutend abschwächen, obgleich Pyrogallol allein von Mangansulfat etwas oxydiert wird. Es muß bemerkt werden, daß im letzten Falle (bei viel Mangan) sofort nach dem Salzzusatz sich ein reichlicher Niederschlag bildet, die Oxydase wird wahrscheinlich mitgerissen.

Wir sehen hier also einen wesentlichen Unterschied zwischen Bertrands Laccase und der Malzoxydase. Diese Frage beabsichtige ich näher zu studieren.

7. Verhalten der Oxydase bei der Keimung.

Ich habe schon erwähnt, daß auch Rohgerste Oxydase enthält; es war von Interesse, zu untersuchen, wie sich die Oxydase während der Keimung verhält. Um möglichst vergleichbare Resultate zu erhalten, wurde in folgender Weise verfahren. Es wurden 900 g sortierte Gerste für neun Proben genommen, die erste Portion, d. h. 100 g, wurde unmittelbar zerkleinert und der Extraktion mit 400 ccm 50%igen Glycerins unterworfen, die übrige Gerste wurde eingeweicht. Nach drei Tagen wurde $\frac{1}{3}$ der eingeweichten Gerste (158 g) im Mörse

zerkleinert und der Extraktion mit 400 ccm 50%igen Glycerins unterworfen; nach weiteren zwei Tagen wurde $\frac{1}{7}$ der schon «gespitzten» Gerste zerkleinert usw., d. h. es wurde immer eine den ursprünglichen 100 g Gerste entsprechende Portion des Malzes für den Versuch entnommen. Von den letzten zwei Malzportionen wurde die eine an der Luft bei gewöhnlicher Temperatur getrocknet (Luftmalz), die zweite erst 24 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur vorgetrocknet, dann 4 Stunden bei 90—100° getrocknet (Darrmalz). Die Extraktion jeder Malzportion dauerte 48 Stunden und deren weitere Behandlung und Versuchsanordnung waren die üblichen.

Es wurden somit neun Auszüge erhalten: 1 aus Rohgerste, 2 aus geweichter Gerste, 3, 4, 5, 6 und 7 aus zwei-, vier-, sechs-, acht- und zehntägigem Malz, 8 aus Luftmalz und 9 aus Darrmalz. Täglich wurden immer zwei Auszüge verglichen:¹⁾ man untersuchte die Autoxydation der Auszüge selbst und deren Verhalten gegen Pyrogallol, d. h. an einem Tage wurden z. B. die Auszüge 1 und 2 untersucht, am folgenden Tage die Auszüge 2 und 3, dann die Auszüge 3 und 4 usw., so daß man schließlich aus der ganzen Kette der Beobachtungen ein Gesamtbild bekommen konnte. Ich will nicht behaupten, daß die von mir gewählte Methode einwandfrei und die einzig mögliche ist, sie erlaubt jedenfalls allgemeine Schlüsse zu ziehen. Die Resultate sind in folgender Tabelle zusammengestellt. Was die Selbstoxydation der Auszüge selbst betrifft, so ist sie gering und beträgt pro 25 ccm Auszugs etwa 1 bis 2,5 ccm absorbierten Sauerstoffs.

Man sieht aus den Versuchen 1 und 2, daß der Auszug 2 energischer wirkt als der Auszug 1; aus den Versuchen 2 und 3, daß der Auszug 3 energischer wirkt als der Auszug 2, also auch als der Auszug 1 usw. Die Oxydasewirkung wächst also im allgemeinen während der Keimung bis zum achten Tag und bleibt dann konstant. Schon das «Schwelken» an der Luft schwächt etwas diese Wirkung ab und das Trocknen bei hoher Temperatur erniedrigt dieselbe sehr bedeutend. Die Malzoxydase

¹⁾ Mehr als vier Versuche an einem Tage auszuführen, war nicht möglich.

ist in diesem allgemeinen Verhalten anderen Malzenzymen, z. B. Diastase ähnlich.

| | 1 | 2 | 2 | 3 | 3 | 4 | 4 | 5 |
|-----------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Absorbierter O | 20,6 | 24,2 | 19,7 | 24,7 | 22,4 | 28,7 | 34,2 | 31,9 |
| Entwickelte CO ₂ | 5,1 | 6,1 | 4,6 | 6,6 | 7,7 | 8,5 | 11,8 | 10,3 |

| | 5 | 6 | 6 | 7 | 7 | 8 | 8 | 9 |
|-----------------------------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
| Absorbierter O | 31,9 | 43,2 | 43,2 | 43,2 | 38,1 | 32,5 | 31,6 | 7,0 |
| Entwickelte CO ₂ | 10,3 | 14,4 | 14,4 | 14,1 | 13,0 | 9,2 | 10,6 | 1,4 |

8. Reduzierende Körper.

Es wurde schon öfters erwähnt, daß in der Gerste und Malz leicht oxydierbare Substanzen vorhanden sind. Ihre Menge ist nicht allzu groß, oder vielmehr sie werden verhältnismäßig langsam durch Luftwirkung oxydiert und es gelingt nicht, sie auf diesem Wege vollkommen zu entfernen. Bei der Extraktion des Malzes aus verschiedenen Keimungsstadien bestimmte man immer die Menge von Sauerstoff, die erstens der vorherigen Behandlung mit Luft und zweitens gleichzeitig mit dem Hauptversuch absorbiert wurde. So z. B. absorbierten 150 ccm des Auszuges (aus Rohgerste) bei der ersten Oxydation 4,4 ccm Sauerstoff und entwickelten 1,4 ccm Kohlensäure, bei der zweiten absorbierten 25 ccm desselben Auszuges 2 ccm Sauerstoff. Diese Zahlen haben allerdings keine quantitative Bedeutung, weil bei geringen Gasquantitäten die Versuchsfehler sehr groß sind. Die Auszüge färben sich so bei dieser Oxydation dunkel und es bildet sich ein flockiger Niederschlag.

Ich versuchte diese Substanzen durch Behandlung der Gerste oder des Malzes vor der eigentlichen Extraktion mit 80%igem Alkohol zu entfernen. In der Tat wurden in dieser Weise viel hellere Auszüge erhalten, welche sich nach der

Oxydation wenig änderten. Leider schwächte die Einwirkung des Alkohols auch die Oxydase.

Die nähere Natur des «reduzierenden» Körpers ist vorläufig unbekannt; es sind weitere Versuche in dieser Richtung geplant.

9. Oxydation in Gegenwart von H_2O_2 .

Man konnte auf Grund der Guajacreaktion, welche nur in Anwesenheit von H_2O_2 erhalten wird, vermuten, daß diese Reaktion von einem besonderen Enzym, Peroxydase, bewirkt wird oder daß die Malzoxydase außer der Oxydation verschiedener Substanzen durch Luftsauerstoff auch deren Oxydation durch Wasserstoffsuperoxyd beschleunigen kann. Ich stellte in dieser Richtung einige qualitative Vorversuche an und gedenke diese Frage näher zu untersuchen.

Die Versuche wurden folgendermaßen ausgeführt.

1. 50 ccm wässriger Lösung des untersuchten Körpers wurden mit 40 ccm schwachen [$0.0173/n$] Wasserstoffsuperoxyds und dann mit 5 ccm des Malzauszuges versetzt.

2. Der Malzauszug wurde vorher im Wasserbad erwärmt;

3. Der Malzauszug wurde nicht zugesetzt, um das Verhalten des Körpers zu H_2O_2 allein zu prüfen.

Die Reaktion wurde in schmalen kleinen Zylindern von gleicher Größe ausgeführt. Sie wurde abends angestellt und über Nacht stehen gelassen.

I. Pyrogallol. 1. Die Flüssigkeit wird nach kurzer Zeit rot: es scheiden sich Kristalle von Purpurogallin aus; 2. und 3. Die Flüssigkeit färbt sich nur gelblich.

II. Hydrochinon. Nach 14 Stunden 1. Die Flüssigkeit war kirschrot ohne Niederschlag; 2. hellrosa; 3. gelb.

III. p-Amidophenol. 1. Reichlicher braunvioletter Niederschlag; 2. geringer Niederschlag, Flüssigkeit dunkel; 3. geringer Niederschlag, Flüssigkeit gelb.

IV. Brenzkatechin. 1. Die Flüssigkeit war dunkelbraun; 2. die Färbung sehr schwach; 3. farblos.

Ähnliche Resultate wurden mit Resorcin, Oxyhydrochinon und anderen Substanzen erhalten. Bei längerem Stehen bildet

sich an der Oberfläche der Flüssigkeiten ein dunkler Ring, was auf die Wirkung der Oxydase hindeutet. Der Fall des Pyrogallols ist unter gewissen Bedingungen besonders charakteristisch: an der Oberfläche bildet sich ein dunkelbrauner Ring, am Boden sammelt sich der rote Niederschlag. Dies deutet auf zwei verschiedene, gleichzeitig verlaufende Reaktionen hin, wobei zwei verschiedene Enzyme mitwirken: eine Oxydase und eine Peroxydase.

Man darf wohl aus allen oben angeführten Versuchen den Schluß ziehen, daß in Gerste wenigstens ein Stoff mit allen Eigenschaften eines oxydaseartigen Enzyms vorhanden ist: seine Fähigkeit, die Oxydationen zu beschleunigen, sein Verhalten gegen Temperatur und gegen verschiedene Reagentien, seine Spezifität etc., alles dies deutet auf die enzymatische Natur dieses Stoffes hin. Seine Rolle bei verschiedenen Prozessen, besonders bei der Keimung ist zweifellos sehr wichtig.

Die Untersuchung wird fortgesetzt.

Warschau, den 1. Juni 1905.

Ein letztes Wort zu den Permanganatversuchen von Kutscher und Seemann.

Von

Richard Burian (Neapel).

(Der Redaktion zugegangen am 28. Mai 1906.)

In Band XLIV, Heft 3 und 4 dieser Zeitschrift sucht Herr Kutscher meine Einwände¹⁾ gegen die Beweiskraft seiner Permanganatversuche²⁾ durch nochmalige Anführung der Tatsache zu widerlegen, daß er unter den Oxydationsprodukten der Nucleinsäuren unverändertes Adenin und ferner Guanidin gefunden hat. Die nachfolgenden Zeilen werden den Unbefangenen davon überzeugen, daß meine Einwände durch diese Tatsache in keiner Weise berührt werden.

Ist es richtig, daß die Harnsäure im Säugetierkörper durch Oxydation von Purinbasen entsteht, so muß, da die Säugetiere weit mehr Harnsäure als Purinbasen ausscheiden, unter den im Organismus gegebenen Oxydationsbedingungen die Harnsäure das stabilere, weniger leicht oxydable Produkt sein. Zur Prüfung dieser an sich unanfechtbaren Schlußfolgerung haben Kutscher und Seemann purinbasenhaltige Nucleinsäuren mit Calciumpermanganat bei schwach alkalischer Reaktion oxydiert und in der Erwartung, daß auch unter diesen Umständen die Harnsäure sich als das stabilere Produkt erweisen werde, die Reaktionsgemische auf Harnsäure untersucht. Sie machten hierbei die keineswegs begründete Voraussetzung, daß die Oxydation einer Substanz mit Permanganat in schwach alkalischer Lösung eine Oxydation «unter Bedingungen, wie sie im Tierkörper gegeben sind»,³⁾ darstelle. Diese Voraussetzung ist, wie unten sub III besprochen werden wird, wenigstens für den vorliegenden Fall sicher unrichtig. Aber selbst angenommen, sie träfe zu, so war doch das ganze Verfahren von Kutscher und Seemann gar nicht geeignet, zu einer Beantwortung der aufgeworfenen Frage zu führen.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 494.

²⁾ Berichte d. Deutsch. chem. Ges., Jahrgang 36, Bd. III, S. 3023; Zentralbl. f. Physiolog., Bd. XVII, S. 715.

³⁾ Kutscher und Seemann, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Jahrgang 36, Bd. III, S. 3024.

I. Zunächst war es unzweckmäßig, den Versuch mit solchen Nucleinsäuren auszuführen, die von Purinbasen hauptsächlich Adenin und Guanin enthalten. Diese Basen werden im Säugetierkörper, gleichviel, ob sie als solche, oder im Verbands des Nucleinsäuremoleküls in denselben gelangen, bekanntlich zunächst durch ein besonderes Enzym zu Hypoxanthin und Xanthin desamidiert.¹⁾ Die unmittelbaren Vorstufen der Harnsäure bei der oxydativen Bildung der letzteren im Organismus können also stets nur freies Hypoxanthin und Xanthin sein. Kutscher und Seemann hätten deshalb im Sinne ihres Versuchsplanes zweckmäßig Hypoxanthin oder Xanthin oder doch wenigstens Nucleinsäuren, deren Purinbasen ganz vorwiegend aus Hypoxanthin und Xanthin bestehen, der Permanganatoxydation unterwerfen müssen.

II. Diese Oxydation hätte ferner, wie ich in meiner Widerlegung auseinandergesetzt habe, eine sehr gemäßigte sein müssen. Um durch Oxydation aus einem Ausgangsmaterial A ein bestimmtes Oxydationsprodukt B zu gewinnen, das selbst oxydabel ist, wenn auch in geringerem Maße als das Ausgangsmaterial A, wird man die Oxydation natürlich niemals zu Ende führen dürfen, um nicht auch das Oxydationsprodukt B völlig zu zerstören. In unserem konkreten Falle würde dies heißen: man hätte die Nucleinsäuren oder nach I. besser das Hypoxanthin resp. Xanthin in der Kälte oder bei Körpertemperatur mit einer **unzureichenden** Menge Permanganat zu behandeln und die Oxydationsflüssigkeiten sodann auf Harnsäure zu prüfen; auf solche Art könnte man vielleicht ein Urteil darüber gewinnen, ob aus dem Xanthin durch das Permanganat als nächste Oxydationsstufe Harnsäure hervorgeht. Statt dessen ließen Kutscher und Seemann das Permanganat (bei schwach alkalischer Reaktion) auf die Nucleinsäuren in der Siedehitze solange einwirken, bis «die Entfärbung des Permanganates während des Siedens erst nach einiger Zeit erfolgte!»²⁾ Es ist klar, daß man bei einem derartigen Vorgehen auch dann keine Harnsäure finden wird, «wenn bei der Oxydation der Nucleinsäuren (resp. des Hypoxanthins oder Xanthins) mit Permanganat intermediär Harnsäure entstehen sollte».³⁾

¹⁾ Jones und Partridge, Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 343, Schittenhelm, Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 251 und Bd. XLIII, S. 228. Vgl. hierzu auch Burian u. Walker Hall, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 372 u. 382. Das in der Nucleinsäure gebundene Adenin resp. Guanin wird zuerst durch ein hydrolysierendes Ferment abgespalten und sodann gleich dem freien Adenin oder Guanin desamidiert: Schittenhelm, Diese Zeitschrift, Bd. XLIII.

²⁾ Kutscher und Seemann, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Jahrgang 36, Bd. III, S. 3024.

³⁾ Burian, Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 495.

Kutscher¹⁾ weist nun freilich darauf hin, daß er bei seinen Oxydationsversuchen unverändertes Adenin und ferner Guanidin, das Oxydationsprodukt des Guanins, erhalten habe, während bei der Oxydation intermediär gebildeter Harnsäure Harnstoff und Oxalsäure entstehen müßten. Er schließt hieraus, daß die in den Nucleinsäuren enthaltenen Purinbasen durch das Oxydationsmittel entweder nicht angegriffen oder gänzlich zerstört werden, niemals aber, auch nicht intermediär, Harnsäure bilden. Dem ist jedoch entgegen zu halten:

1. daß Kutscher und seine Mitarbeiter bei der Oxydation der Nucleinsäuren in allen Fällen neben anderen Produkten auch Harnstoff und Oxalsäure erhalten haben,²⁾ und zwar den Harnstoff in so reicher Ausbeute, daß er sich keineswegs bloß auf die Oxydation des Guanins zu Guanidin und Harnstoff beziehen ließ;³⁾

2. daß die von Kutscher und Seemann verwendeten Nucleinsäuren an Purinbasen besonders reichlich Adenin und Guanin, d. h. also Substanzen enthielten, für die es von vornherein ausgeschlossen ist, daß sie durch bloße Oxydation ohne vorhergehende Desamidierung in Harnsäure übergeführt werden können.

Daß bei den Oxydationsversuchen von Kutscher und Seemann das in den Nucleinsäuren enthaltene Guanin resp. Adenin, Guanidin resp. unverändertes Adenin geliefert hat, ist in Anbetracht des Verhaltens des freien Guanins resp. Adenins gegen Permanganat durchaus selbstverständlich. Auf der anderen Seite könnte sich aber aus dem in den Nucleinsäuren gleichfalls, wenn auch spärlicher vorhandenen Hypoxanthin resp. Xanthin⁴⁾ sehr wohl durch die Einwirkung des Oxydationsmittels zunächst Harnsäure gebildet haben, aus welcher letzterer dann weiterhin ein Teil des gefundenen Harnstoffes und der Oxalsäure hervorgegangen wäre.

III. Daß es sich wirklich so verhalten habe, d. h., daß bei der Oxydation von Hypoxanthin resp. Xanthin mit Permanganat tatsächlich

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 318.

²⁾ Vgl. Kutscher und Seemann, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Jahrgang 36, Bd. III, S. 3025. Zentralbl. f. Physiologie, Bd. XVII, S. 718; ferner Kutscher und Schenk, Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 310 u. 316.

³⁾ Kutscher und Seemann, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Jahrgang 36, Bd. III, S. 3026.

⁴⁾ Daß die nach den gebräuchlichen Methoden und besonders die nach dem Verfahren von Kossel und Neumann dargestellten Nucleinsäurepräparate meist Hypoxanthin und Xanthin enthalten, obgleich es noch fraglich ist, ob diese Basen im Nucleinsäuremolekül präformiert sind oder erst während der Präparation aus dem Adenin und Guanin der Nucleinsäuren entstehen, darüber vgl. meinen Artikel in den «Ergebn. d. Physiol.», Jahrg. 3, Bd. I, S. 81 und 85.

als nächste Oxydationsstufe Harnsäure auftrete, soll hiermit durchaus nicht behauptet oder auch nur als wahrscheinlich hingestellt werden. Die Oxydation mit Permanganat in schwach alkalischer Lösung entspricht in dem vorliegenden Falle eben ganz und gar nicht den «Bedingungen, wie sie im Tierkörper gegeben sind». Für diesen letzteren ist es durch zahlreiche Organextraktversuche, insbesondere durch die von Schittenhelm¹⁾ und die von mir²⁾ ausgeführten, mit voller Sicherheit erwiesen, daß in verschiedenen Organen eine (isolierbare) Oxydase, die Xanthinoxydase, enthalten ist, welche Hypoxanthin und Xanthin, **nicht aber Harnsäure** zu oxydieren vermag. Die Unfähigkeit der Xanthinoxydase, auf die einmal gebildete Harnsäure einzuwirken, ergibt sich sowohl aus jenen Experimenten, in denen es gelang, durch Organextrakte, resp. durch die Fermentlösung eine vollständige Überführung der Purinbasen in Harnsäure zu erzielen,³⁾ wie auch aus dem ganzen quantitativen Verhalten der Reaktion.⁴⁾ Die Wirkungsweise einer solchen spezifischen Oxydase, welche zwar die (zyklischen) Amidinbindungen des Hypoxanthins resp. Xanthins, aber nicht den Trikarbonkern der Harnsäure anzugreifen imstande ist, muß natürlich gänzlich verschieden sein von der Wirkungsweise des Permanganates, dieses besten Harnsäurezerstörungsmittels!

Es dürfte deshalb auch nur von untergeordnetem Interesse sein, jenen Versuch auszuführen, der den einzigen gangbaren Weg zur Lösung der von Kutscher aufgeworfenen Frage darstellen würde: nämlich Hypoxanthin oder Xanthin in der Kälte oder höchstens bei Körpertemperatur mit einer unzureichenden Menge Permanganates zu behandeln und das Reaktionsgemisch dann auf Harnsäure zu prüfen. Für die Beurteilung der **physiologischen** Verhältnisse wenigstens ist es, in Anbetracht der völligen Sicherheit, mit der die oxydative Bildung der Harnsäure im Säugetierkörper festgestellt erscheint, ganz gleichgültig, wie sich die Purinbasen gegen Permanganat verhalten.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 251 und Bd. XLIII, S. 228.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 497.

³⁾ Spitzer, Pflügers Archiv, Bd. LXXVI, S. 197, Vers. 6. Schittenhelm, Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 256, Vers. 1 etc.

⁴⁾ Burian, Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 514, 522 und 528.

Zur Fibrinoglobulinfrage.

Bemerkungen zu der gleichnamigen Arbeit von W. Huiskamp.¹⁾

Von

Dr. Wolfgang Heubner (München).

(Der Redaktion zugegangen am 7. Juni 1905.)

In seiner eben erschienenen Arbeit berührt W. Huiskamp von neuem die Frage, in welchen Beziehungen die drei Körper Fibrinogen, Fibrin und Fibrinoglobulin zu einander stehen, besonders inwieweit sie sich beim Vorgang der Gerinnung ineinander umsetzen. Dabei kommt er auf Grund seiner Versuchsergebnisse zu dem Schluß, daß die Formulierung Schmiedebergs, wonach aus einem Molekül Fibrinogen bei der Gerinnung durch hydrolytische Spaltung ein Molekül Fibrin und ein Molekül Fibrinoglobulin entstehen, nicht aufrecht erhalten werden könne. Leider bin ich zur Zeit durch äußere Umstände verhindert, die Angaben Huiskamps experimentell nachzuprüfen, jedoch möchte ich nicht versäumen, einige Bedenken zu äußern, die sich dem mit dem Gegenstand Vertrauten bei der Lektüre dieser Arbeit von vornherein aufdrängen.

Alle Schlussfolgerungen Huiskamps gehen von der scheinbar selbstverständlichen Voraussetzung aus, daß die von ihm dargestellten «Fibrinogenlösungen» wirklich nichts anderes als Fibrinogen (und eventuell Fibrinoglobulin) enthielten. Leider gibt er keine genaue Schilderung von seinem Darstellungsverfahren, es heißt nur «nach Hammarsten» und «durch dreimalige Fällung mit Kochsalz aus Oxalatplasma». Da nirgends etwas von Neutralisation des Plasmas vor der Ausfällung erwähnt ist, muß ich annehmen, daß dies unterblieben ist, und damit wäre für mich ohne weiteres erwiesen, daß Huiskamps «Fibrinogenlösungen» unreine Eiweißlösungen mit etwas Fibrinogengehalt waren. Ich habe zu der Zeit, als ich mich mit der Frage beschäftigte,²⁾ zwei Monate lang in «Fibrinogenlösungen nach Hammarsten» die größten Unregelmäßigkeiten, zumal in bezug auf die bei Erwärmen auf 58° ausfallende Eiweißmenge gefunden, ohne es mir erklären zu können, bis ich endlich entdeckte, daß meine Lösungen stets einen ziemlichen Prozentsatz

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 182.

²⁾ Die Spaltung des Fibrinogens bei der Fibringerinnung. — Arch. f. experim. Pathol. und Pharmakol. Bd. XLIX, S. 229.

Paraglobulin enthalten hatten, und daß die Hammarstenschen Vorschriften nur bei Anwendung neutralen Plasmas zu reinen Fibrinogenlösungen führen. Ich habe diese Tatsache in der erwähnten Arbeit genauer besprochen und bewiesen. Inzwischen hat Herr Dr. Morawitz bei seinen Arbeiten über Fibrinferment im physiologisch-chemischen Institut in Straßburg¹⁾ meine Behauptung als richtig befunden und mir die Notwendigkeit, auf diese Fehlerquelle zu achten, mündlich bestätigt.

Demnach hat Huiskamp den Beweis für die Reinheit seiner Fibrinogenlösungen («Reinheit» auch im Hammarstenschen Sinne) nirgends erbracht; der bloße Nachweis der Koagulationstemperatur und der Fähigkeit der Gerinnung mit Ferment genügt nicht, da Blutplasma und beliebig herzustellende Gemische die gleichen Erscheinungen zeigen, wenn sie nur etwas Fibrinogen enthalten.

Alles bisher Gesagte gilt ebenso für die «Fibrinogenfällungen» Huiskamps mit Fluornatrium. Auch hier bleibt der Beweis zu erbringen, daß wirklich der ganze Niederschlag aus Fibrinogen bestand, ja hier umsomehr, als ja die angewandten Fluornatriumlösungen alkalisch reagierten.

Daß man in Lösungen, die eventuell mehrere Eiweißkörper enthalten, keine quantitativen Trennungen durch Hitze-koagulation vornehmen kann, da immer der eine den anderen mitreißt, braucht nicht besonders ausgeführt zu werden; dazu kommt noch ein weiterer Umstand, der Huiskamps Trennungen des Fibrinogens vom Fibrinoglobulin durch Erhitzen auf 58° in fragliche Beleuchtung stellt. Seine Lösungen enthielten stets neben etwa 0,5% Eiweiß 3—5% Salz. Solche Salzmengen können aber den Koagulationsgrad für die einzelnen Eiweißkörper bereits wesentlich modifizieren, besonders aber auch ihr gegenseitiges Verhalten, Mitausfallen usw. Auch hier hätte erst ein besonderer Beweis erbracht werden müssen, daß sich solche salzreichen Fibrinogenlösungen in diesem Punkte genau so verhalten wie salzarme.

Ich sehe mich also nicht imstande, die Schlußfolgerungen Huiskamps als berechtigt anzuerkennen, und kann seine noch anfechtbaren Versuche vorläufig nicht als Einwand gegen die von mir verteidigte Formel Schmiedebergs für den Vorgang bei der Fibringerinnung gelten lassen.

¹⁾ Zur Kenntnis der Vorstufen des Fibrinferments. — Hofmeisters Beitr., Bd. IV, 1904, S. 381.

Über Fütterungsversuche mit Monoaminosäuren bei Cystinurie.

Von

Charles E. Simon, M. D., Baltimore, Md. U. S. A.

(Aus dem Laboratorium von Dr. Charles E. Simon.)

(Der Redaktion zugegangen am 14. Juni 1905.)

Vor kurzem berichteten Loewy und Neuberg über Fütterungsversuche mit verschiedenen Aminosäuren bei Cystinurie.¹⁾ Die Autoren gelangten zu der Ansicht, daß es sich bei diesem Zustand um eine Störung des Aminosäurestoffwechsels in weit bedeutenderem Stile handle, als bisher angenommen wurde. Sie geben an, daß nach Einführung von 6 g Tyrosin ca. 5 g und von 5 g Asparaginsäure ca. 3—4 g im Harne wiedergefunden wurden. Sie betonen, daß die Wahl der genannten Aminosäuren lediglich in Rücksicht auf analytische Verhältnisse erfolgte, und sprechen die Vermutung aus, daß jede andere Aminosäure der α -Reihe ganz das gleiche Verhalten zeigen würde.

Betreffs der Diaminosäuren kamen Loewy und Neuberg ferner zu dem Ergebnis, daß, nach Verfütterung von Lysin, Cadaverin und nach Darreichung von Arginin Putrescin im Harne erscheint. Sie hatten also in dieser Richtung die Ansicht experimentell begründet, welche ich schon vor mehreren Jahren ausgesprochen habe und die wohl auch allgemein als akzeptiert gelten konnte.

Loewy und Neuberg bemerken, daß, obgleich ihre Versuche bisher nur an einem Cystinuriker ausgeführt worden sind, kein Grund zur Annahme vorliegt, daß sich andere Fälle wesentlich abweichend verhalten.

Da mir vor kurzem ein Fall von Cystinurie zur Verfügung stand, schien es mir von Interesse, näher auf die obigen Ver-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 338.

suche einzugehen. Leider wurde ich jedoch durch äußere Umstände verhindert, weitgehendere Untersuchungen anzustellen. Ich konnte jedoch konstatieren, daß die Mutmaßungen Loewys und Neubergs, daß sich alle Cystinuriker dem ihrigen gleich verhalten würden, nicht zutreffen möchten. Nach Einführung von 4—5 g Tyrosin war ich wenigstens nicht imstande, die Substanz im Harn der nächsten 36 Stunden nachzuweisen.

Wie in Loewy und Neubergs Versuchsperson, so wurden in diesem Individuum gleichfalls Diamine vermißt; doch möchte ich bemerken, daß diese nicht nur in den 3 Fällen von Baumann-Udranszky und Brieger-Stadthagen nachgewiesen worden sind. Meine eigenen Beobachtungen in dieser Richtung sind den Autoren anscheinbar entgangen.¹⁾

¹⁾ Amer. Journ. med. sc., vol. CXIX, p. 39; *ibid.*, vol. CXXIII, p. 838; Johns Hopkins Hosp. Bull., vol. XV, p. 365.

Über den Nachweis von Fruchtzucker in menschlichen Körpersäften.

Von

Dr. Rudolf Ofner.

(Aus dem chem. Laboratorium der k. k. deutschen Universität in Prag.)

(Der Redaktion zugegangen am 17. Juni 1906.)

Neuberg und Strauß¹⁾ haben zum Zwecke des Nachweises von Fruchtzucker in menschlichen Körpersäften eine Methode ausgearbeitet, welche auf dem von Neuberg²⁾ aufgestellten Satze, daß ausschließlich nur Ketosen, nicht aber Aldosen imstande sind, mit sekundären asymmetrischen Hydrazinen Osazone zu bilden, begründet ist. Dieser Satz stimmt jedoch, wie meine Untersuchungen gezeigt haben,³⁾ mit den Tatsachen durchaus nicht überein. Ich habe einerseits den Beweis erbracht, daß reines Benzylphenylhydrazin weder mit Fruktose noch mit Glukose ein kristallisiertes Osazon zu bilden vermag,⁴⁾ andererseits ist es mir auch gelungen, das Methylphenylosazon der Glukose aus Methylphenylhydrazin und

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVI, S. 233 (1902).

²⁾ Berl. Ber., Bd. XXXV, S. 959 u. 2626 (1902).

³⁾ Monatsh. f. Chemie, Bd. XXV, S. 1153 (1904).

⁴⁾ Das von Neuberg (l. c.) irrthümlich als Benzylphenylosazon der Fruktose beschriebene Produkt ist, wie ich zeigen konnte (Monatshefte für Chemie, Bd. XXV, S. 1153), de facto ein gemischtes Phenyl-Benzylphenylosazon, das sich auch aus der Glukose unter den gleichen Verhältnissen bildet, wenn man nämlich käufliches Benzylphenylhydrazin in Anwendung bringt, das nach meinen Untersuchungen (Monatshefte f. Chemie, Bd. XXV, S. 592) neben einer beträchtlichen Menge Benzylidenbenzylphenylhydrazon stets mehr oder weniger Phenylhydrazin enthält.

Glukose darzustellen,¹⁾ sodaß auch diesem Reagens, welches die Hauptstütze des von Neuberg aufgestellten Satzes bildet, die ihm zugeschriebene Bedeutung abgeht. Zunächst hatte es sich mir nur darum gehandelt, die Tatsache festzustellen, daß sich das mit dem Methylphenylfruktosazon identische Produkt auch aus der Glukose darstellen läßt, weshalb ich bei dieser Beweisführung die Bedingungen der für die Fruktose geltenden Vorschrift Neubergs nicht eingehalten habe. Gleichzeitig konnte ich feststellen, daß reine Fruktose unter den gleichen Umständen in viel kürzerer Zeit und in bedeutend besserer Ausbeute das Osazon zu bilden vermag als reine Glukose und daß daher die Ausscheidung der Osazonkristalle für die Gegenwart von Fruktose unbedingt beweisend ist, wenn sie sich innerhalb von höchstens 5 Stunden bei Zimmertemperatur vollzogen hat. Doch ist diese Zeitdauer der freiwilligen Ausscheidung nur bei reinen Fruktoselösungen zu erreichen. Gleiche oder größere Mengen Glukose neben Fruktose verzögern die freiwillige Ausscheidung des Fruktosazons oft sehr bedeutend.

Nun ist nach der Vorschrift von Neuberg und Strauß²⁾ die Lösung, welche auf Fruktose untersucht werden soll, nach Zusatz der entsprechenden Mengen Methylphenylhydrazin und Essigsäure bei einer Temperatur bis zu 40° durch 24 Stunden zu erwärmen. Hierbei resultiert in der Regel ein Öl, aus dem sie auf eine nicht gerade einfache Weise das Osazon isolieren. Diese Methode erweist sich aber für den Nachweis der Fruktose vollständig unbrauchbar; denn unter diesen Verhältnissen und mitunter in noch viel kürzerer Zeit geben, wie die nachstehenden Versuche lehren, auch Glukoselösungen stets das Osazon, wofern die Konzentrationsverhältnisse günstig sind. Auf letzere wird in der Vorschrift von Neuberg und Strauß keine Rücksicht genommen und gerade von der Konzentration hängt es bei diesem Verfahren ab, ob das Osazon nach der 24stündigen Reaktionsdauer in Glukoselösungen bereits gebildet oder etwa schon zersetzt ist. Doch auch aus Fruktoselösungen läßt sich bei ungünstig gewählter

¹⁾ l. c.

²⁾ l. c.

Konzentration nach 24stündiger Reaktionsdauer infolge eingetretener Zersetzung kein Osazon isolieren. Wenn nun Neuberg und Strauß unter den von ihnen angegebenen Bedingungen aus Glukoselösungen kein Osazon zu erhalten vermochten, so lag dies jedenfalls an der zufällig ungünstig getroffenen Konzentration der Lösungen.

Das von diesen Forschern angewendete Verfahren zum Nachweise des Fruchtzuckers in menschlichen Körpersäften sei hier in seinen wesentlichen Zügen wiedergegeben: Die von den Eiweißstoffen und Salzen zum größten Teile befreite alkoholische Lösung wird auf ein kleines Volumen von ungefähr 30 ccm verdampft — es wird hierbei, wie schon oben erwähnt wurde, von einer Rücksichtnahme auf die Konzentration der Zuckerlösung nichts gesprochen — und mit der entsprechenden Menge Methylphenylhydrazin versetzt, einige Stunden stehen gelassen und nötigenfalls filtriert. Hierauf erfolgt der Zusatz der entsprechenden Menge 50%iger Essigsäure und von soviel Alkohol, daß eine klare Lösung entsteht. Diese wird nun 24 Stunden lang im Brutschranke auf 40° (an einem andern Orte¹⁾) heißt es bis höchstens 40° erwärmt. Bei größerer Menge Fruchtzucker scheidet sich das Osazon direkt kristallinisch, eventuell nach Zusatz von etwas Wasser, ab. Bei geringerer Menge erhält man das Osazon auf Wasserzusatz zunächst als Öl, das bei öfterem Reiben eventuell nach Impfung fest wird. Um schneller zum Ziele zu gelangen, wird das freiwillig oder durch Wasserzusatz ausgeschiedene ölige Methylphenylosazon durch Abgießen von der Mutterlauge getrennt und nochmals durch Dekantieren mit kaltem Wasser gewaschen, hierauf im Vacuum über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet, das resultierende Harz in absolutem Alkohol gelöst und in eine Kältemischung von fester Kohlensäure und Äther gestellt. Das ausgeschiedene Osazon wird aus stark verdünntem Pyridin umkristallisiert.

Diese Vorschrift habe ich in einer ganzen Reihe von Versuchen bei Glukoselösungen vollständig eingehalten und hierbei in den meisten Fällen beträchtliche Mengen von Osazon zu iso-

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVII, S. 4616.

lieren vermocht. In den Fällen, in denen ich nicht kristallinisches Osazon, sondern ölige Produkte erhielt, habe ich letztere zum Zwecke der Isolierung des Osazons zum Teile nach Vorschrift behandelt, im allgemeinen es jedoch vorgezogen, das durch Reiben festgemachte Produkt bloß mit Äther zu digerieren und das Osazon auf diese einfachere Weise zu isolieren. Das so gewonnene Produkt wurde durch Umkristallisieren in kristallinische Form übergeführt. Untersucht wurden Lösungen reiner Glukose (Tabelle A), neben denen häufig gleichzeitig Parallelversuche mit reiner Fruktose angestellt wurden (Tabelle B), ferner Gemische von Glukose und Fruktose, normaler Harn, dem in dem einen Falle Glukose, in dem andern Fruktose zugesetzt wurde, schließlich Diabetesharn, der frei von Fruktose gewesen ist.

Die Versuche, welche mit Lösungen reiner Glukose (Tabelle A) und reiner Fruktose (Tabelle B) angestellt wurden, sind der leichtern Übersicht halber in den nachstehenden Tabellen zusammengefaßt, wobei jedesmal besonders auf die Konzentration des in Wasser gelösten Zuckers Rücksicht genommen wird. Das relative Verhältnis des Zuckers zu dem angewendeten Methylphenylhydrazin und der 50%igen Essigsäure bleibt bei allen Versuchen dasselbe. Anschließend an die Tabelle erfolgt die Anführung der Beobachtungen, die sich an die einzelnen Versuche geknüpft haben.

Zu Tabelle A. Lösungen reiner Glukose.

I. Nach Ablauf von 24 Stunden war etwas Öl ausgeschieden. Die trübe Flüssigkeit wurde vom Öle abgegossen, mit Wasser versetzt, stark gerieben und geimpft. Nach kurzer Zeit resultierte das Osazon in Form von rotgelben Nadeln. Die Kristalle wurden nach 2 Stunden abgesaugt. Aus dem Öle selbst wurde durch Digerieren mit Äther ebenfalls etwas Osazon isoliert.

Die Versuche II und III wurden in der gleichen Weise wie I behandelt und lieferten ebenfalls beim Reiben kristallinisches Osazon, der unter III in der Tabelle angeführte 2. Versuch sogar ohne Impfung.

Tabelle A (Glukoselösungen).

| Versuchs-
zahl | Zucker
in g | Wasser
in ccm | Konzentration
des
Zuckers:Wasser | Alkohol
in ccm | Tem-
pera-
tur | Stunden | Aus-
beute
in % |
|--------------------|----------------|------------------|--|-------------------|----------------------|---|-----------------------|
| A I | 2 | 30 | 1 : 15 | 5 | 37° | 24 | 19 |
| II | 2 | 40 | 1 : 20 | 5 | 37° | 24 | 20 |
| III { | 1,5 | 30 | 1 : 20 | 5 | 37° | 24 | 27 |
| | 2 | 35 | 1 : 17,5 | 5 | 37° | 24 | 12 |
| IV {
a {
b { | 2 | 30 | 1 : 15 | 5 | 37° | 24 Std. bei 37°,
weitere 24 Std.
b. Zimmertemp. | 14 |
| | 2 | 35 | 1 : 17,5 | 5 | 38° | | 17 |
| | 2 | 40 | 1 : 20 | 5 | 38° | | 19 |
| V | 3,6 | 30 | 1 : 8,3 | 5 | 40° | 24 | ca.13 |
| VI | 3,6 | 30 | 1 : 8,3 | 5 | 37-38° | 24 | 15 |
| VII { | 3,6 | 30 | 1 : 8,3 | 5 | | 40° | 18 |
| | 3,6 | 30 | 1 : 8,3 | 5 | 40° | 15 | 9 |
| VIII | 3,6 | 20 | 1 : 5,5 | 10 | 40° | 24 | 0 |
| IX | 3,6 | 20 | 1 : 5,5 | 10 | 30° | 24 | 17 |
| X { | 1,8 | 5 | 1 : 2,8 | 5 | 30° | 24 | 6,5 |
| | 1,8 | 5 | 1 : 2,8 | 12 | 30° | 24 | 4,6 |

Tabelle B (Fruktoselösungen).

| | | | | | | | |
|-----|-----|----|--------|-------|-----|----|----|
| B I | 3,6 | 20 | 1:5,5 | 5 | 30° | 24 | 58 |
| II | 1,8 | 30 | 1:16,7 | 12 | 30° | 24 | 23 |
| III | 1,8 | 5 | 1:2,8 | 5(12) | 30° | 24 | 0 |
| IV | 1,8 | 30 | 1:16,7 | 7 | 40° | 24 | 50 |
| V | 3,6 | 8 | 1:2,2 | 8 | 40° | 24 | 0 |

IV. Dieser Versuch ist deshalb erwähnenswert, weil sich hier das Osazon ohne weitere Behandlung freiwillig kristallinisch ausgeschieden hatte, doch war in diesem Falle die Reaktionsdauer von 24 Stunden überschritten.

In den nachfolgenden Fällen gestaltete sich die Ausbeute bereits ungünstiger, auch konnte das Osazon nicht schon durch bloßes Reiben kristallinisch erhalten werden; der Grund liegt in der Konzentration, die in allen diesen Versuchen bedeutend stärker war als in den oben angeführten.

V. Schon nach 16 Stunden war dunkles Öl ausgeschieden. Doch erst nach Verlauf von 24 Stunden wurde dasselbe gewaschen, getrocknet, das resultierende Harz nach Vorschrift in absolutem Alkohol gelöst und in ein Kältegemisch von fester Kohlensäure und Äther gestellt. Hierbei schied sich nur ein Teil des Osazons aus, während der größere aus der Mutterlauge durch Verdunsten des Alkohols und nachheriges Digerieren mit Äther isoliert wurde. Aus verdünntem Pyridin umkristallisiert, resultierten gelbbraune Nadeln vom Schmelzpunkte 148° .

VI. In diesem Versuche wurde die vom Öle abgegossene Mutterlauge mit dem Waschwasser des Öles vereinigt und lieferte nach öfterm Reiben kristallinisches Osazon. Das Öl selbst wurde nach dem Waschen getrocknet und mit Äther digeriert und ergab den übrigen Teil des Osazons.

VII. Hier wurde aus dem Öle schon nach 18stündiger, bzw. 15stündiger Reaktionsdauer das Osazon erhalten.

VIII. Bei einer Temperatur von 40° wurde bei diesem Versuche kein Osazon erhalten. Das gleiche Reaktionsgemisch lieferte jedoch bei 30° (Versuch IX) 17% Osazon. Das Öl mußte durch Wasserzusatz zur Ausscheidung gebracht werden.

X. Bei noch stärkerer Konzentration resultierte bei einer Temperatur von 30° immer noch etwas Osazon.

Die oben angeführten Versuche lassen erkennen, daß für die Darstellung des Methylphenylosazons aus der Glukose bei einer Reaktionsdauer von 24 Stunden eine Temperatur von ungefähr 37° sowie eine Konzentration, bei welcher auf 1 Teil Glukose 20 Teile Wasser entfallen, die besten Resultate erzielt wurden. Die angewendete Alkoholmenge war in allen diesen Fällen eine geringe. Bei starker Konzentration und einer Temperatur von 40° resultiert gewöhnlich ein stark zersetztes öliges Produkt, aus welchem sehr wenig oder gar kein Osazon zu gewinnen ist.

Zu Tabelle B. Lösungen mit reiner Fruktose.

I. Bei 30° war schon nach 1 Stunde eine starke Trübung eingetreten, nach 15 Stunden war die Ausscheidung des Osazons bereits beendet.

II. In diesem Versuche war die Ausbeute bedeutend geringer; ein Parallelversuch mit einer Glukose ergab nur äußerst wenig Osazon.

III. Infolge starker Konzentration selbst bei 30° kein Osazon, während Glukose unter den gleichen Verhältnissen eine Ausbeute von 6,5% bzw. 4,6 ergeben hat.

IV. Die Ausscheidung des kristallinen Osazons war schon nach 7 Stunden beendet, nach 24 Stunden war schon teilweise Zersetzung eingetreten.

V. In dieser ziemlich stark konzentrierten Lösung war das Osazon nach 5 Stunden kristallinisch ausgeschieden. Bei weiterer Einwirkung begann es sich jedoch allmählich zu zersetzen, sodaß nach 24stündiger Reaktionsdauer nur ein dunkles Öl vorhanden war, aus dem sich gar nichts mehr isolieren ließ. Das Öl löste sich selbst nach längerem Reiben vollständig in Äther auf.

Aus diesen Versuchen ist zu ersehen, daß die Fruktose unter günstigen Bedingungen nach 24stündiger Reaktionsdauer eine bedeutend bessere Ausbeute liefert als die Glukose, daß sie viel schneller reagiert und besonders in stark konzentrierter Lösung schon in kurzer Zeit Osazon bildet, welches jedoch in diesem Falle nach 24stündiger Einwirkung vollständig zersetzt ist. Unter den letzteren Verhältnissen ist somit bei Beobachtung der Vorschrift von Neuberg und Strauß selbst aus Fruktose nach 24stündiger Erwärmung auf 40° kein Osazon zu erhalten.

Lösungen mit Glukose neben Fruktose.

I. 1,3 g Glukose und 0,5 g Fruktose wurden in 15 ccm Wasser gelöst und nach Zusatz von 4 g Methylphenylhydrazin, 4 ccm 50%iger Essigsäure und 10 ccm Alkohol im Brutschranke auf 40° durch 24 Stunden erwärmt. Das ausgeschiedene Öl wurde mit Wasser dekantiert, geimpft, im Vacuum

über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet, in absolutem Alkohol gelöst und in ein Kältegemisch von fester Kohlensäure und Äther gestellt. Es konnte das Osazon nicht isoliert werden.

II. 1,8 g Glukose und 1,8 g Fruktose wurden in 20 ccm Wasser (1:5,5) gelöst, mit den molekularen Mengen Methylphenylhydrazin und Essigsäure und mit 13 ccm Alkohol versetzt. Aus dem dunklen Öle, welches nach 24 stündiger Reaktionsdauer bei 40° erhalten wurde, ließ sich nicht einmal eine geringe Menge Osazon isolieren.

III. Aus einer Mischung, welche 0,9 g Glukose und 0,9 g Fruktose, gelöst in 10 ccm Wasser, neben der molekularen Menge von Methylphenylhydrazin und 50%iger Essigsäure enthielt, hat sich bei Zimmertemperatur erst nach 15 Stunden kristallisiertes Osazon freiwillig ausgeschieden, während das bei Abwesenheit von Glukose aus einer Lösung von 0,9 g Fruktose und ebenso aus 1,8 g Fruktose in 10 ccm Wasser ausgeschiedene Öl bald erstarrte, sodaß die Ausscheidung des kristallisierten Osazons schon nach 4 bis 5 Stunden beendet war.

IV. Ebenso zeigte sich die Verzögerung der freiwilligen Osazonabscheidung bei einem Reaktionsgemisch von 1,3 g Glukose und 0,5 g Fruktose. Doch ließ sich in diesem Falle, sowie in dem Versuche III, aus einem Teile der Probe das Osazon durch Impfen und Reiben schon nach 5 Stunden isolieren.

Normaler Harn mit Zucker versetzt.

I. 200 ccm normalen Harns wurden in frischem Zustande mit etwas Essigsäure angesäuert, hierauf mit 4 g Glukose versetzt und bei niedriger Temperatur im Vacuum zu einem dünnen Sirup eingedampft. Dieser wurde mit Alkohol aufgeköcht, filtriert, mit Tierkohle behandelt und auf ein Volumen von 30 ccm eingeengt. Nach Zusatz von 8,5 g Methylphenylhydrazin wurde die Lösung durch 5 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur stehen gelassen, filtriert, mit 8,5 ccm 50%iger Essigsäure und 20 ccm Alkohol versetzt und in den Thermostaten bei einer Temperatur von 30° gestellt. Nach 24 Stunden wurde die infolge der etwas größeren Alkoholmenge klar ge-

bliebene Lösung mit Wasser versetzt und längere Zeit gerieben. Das resultierende Produkt wurde nach 2 Stunden abfiltriert und zweimal mit Äther digeriert. Ausbeute 8%.

II. Ein ganz gleich ausgeführter Versuch mit 4 g Fruktose ergab nach 24 Stunden ein dunkles Öl, aus welchem nur 16% der theoretischen Menge an Osazon isoliert werden konnten.

Diabetes-harn.

I. Dieser Harn ergab bei der Polarisation einen Gehalt von 7,1% Traubenzucker; die Titration nach Fehling zeigte 7,5% an reduzierender Substanz, die Polarisation nach erfolgter Gärung eine ganz schwache Linksdrehung entsprechend 0,1%. Es war daher kein Fruchtzucker vorhanden.

Von diesem Harn, der sofort nach der Ausscheidung angesäuert worden ist, wurden 2 Portionen von je 160 ccm im Vacuum unter 40° eingedampft und der sauer reagierende dünnflüssige Sirup nach Vorschrift weiter behandelt. Die resultierende alkoholische Lösung von 30 ccm Volumen, enthaltend ungefähr 12 g Glukose, wurde mit den molekularen Mengen Methylphenylhydrazon und 50%iger Essigsäure versetzt und durch 24 Stunden auf 30° erwärmt. Hierauf wurde das Öl durch Wasserezusatz ausgefällt, durch längeres Reiben festgemacht und mit Äther behandelt. Aus der einen Portion erhielt ich ungefähr 3 g Osazon, die aus dem Öle gewonnen wurden, und außerdem 0,7 g Osazon, das sich aus der vom Öle abgegossenen Mutterlauge nachträglich ausgeschieden hatte. Im ganzen 14,5% der Theorie.

Die andere Portion zeigte die gleichen Verhältnisse und ergab eine gleiche Ausbeute.

Dagegen erhielt ich aus einer in analoger Weise aus dem Harn desselben Patienten gewonnenen alkoholischen Lösung von 33 ccm, enthaltend 7,6 g Glukose, bei 40° ein dunkles Öl, aus dem nur eine Spur Osazon zu isolieren war. Für die Temperatur von 40° war eben selbst diese Konzentration noch viel zu groß.

II. Ein anderer Harn, der bei der Polarisation 6,1% Glukose zeigte, bei der Titration 6,6% reduzierender Substanz

ergab und nach erfolgter Gärung im Sinne von 0,2% links drehte, wurde der Vorschrift entsprechend behandelt und lieferte schließlich eine ungefähr 4,5 g Glukose enthaltende alkoholische Lösung von 53 ccm, welche nach Zusatz der molekularen Menge Methylphenylhydrazin und Essigsäure auf 40° erwärmt, schon nach 16 Stunden ein Öl ergab, aus dem 0,9 g = 10% der theoretischen Menge an Osazon gewonnen wurden.

III. Eine zweite Probe dieses Harns mit 3 g Glukose in 35 ccm einer wenig alkoholischen Lösung gab nach 24 Stunden bei 37° ungefähr 0,72 g = 10% Osazon. Auch hier schied sich aus der vom Öle abgegossenen Flüssigkeit nach einiger Zeit kristallinisches Osazon aus, ohne daß geimpft worden wäre.

Analoge Versuche mit Ascites- oder Pleuraflüssigkeiten konnten aus Mangel an Material nicht durchgeführt werden, doch reichen bereits die ohigen Versuche vollständig hin, um die Unbrauchbarkeit des Neuberg-Straußschen Verfahrens in seiner gegenwärtigen Form zu demonstrieren.

Es muß deshalb dahin gestellt bleiben, ob in den von Neuberg und Strauß untersuchten Körpersäften tatsächlich Fruktose enthalten war. Beweisend für die Gegenwart von Fruchtzucker ist die Abscheidung des Osazons nur dann, wenn sie bei Zimmertemperatur in höchstens 5 Stunden erfolgt, doch ist die freiwillige Abscheidung in dieser Zeit, wie schon oben erwähnt wurde, nur unter besonders günstigen Verhältnissen zu erzielen. Jedenfalls muß, sobald Fruktose vorhanden ist, die Osazonbildung innerhalb dieser Zeit vor sich gegangen sein, wenn auch infolge ungünstiger Umstände die freiwillige Abscheidung nicht erfolgt ist. In diesen Fällen ist es daher notwendig, das Osazon durch Impfen und Reiben eventuell nach vorhergegangennem Wasserzusatz zu isolieren. Weit ungünstigere Fälle als Gemische reiner Fruktose und Glukose sind die menschlichen Körpersäfte. Wird die diesbezügliche Untersuchung ergeben, daß in diesen Produkten, sobald sie mit Fruktose versetzt sind, das Osazon nach 5stündiger Reaktionsdauer bei Zimmertemperatur sich in verhältnismäßig einfacher Weise stets isolieren läßt, so wird die Bildung des von Neuberg

zuerst dargestellten Methylphenylfruktosazons tatsächlich zum Nachweise der Fruktose dienen können. Es bleibt daher vorläufig die Seliwanoffsche Reaktion noch die beste Methode zum Nachweise des Fruchtzuckers, doch ist dieselbe genau unter den von mir angegebenen Bedingungen¹⁾ (Zusatz von etwas Resorcin und soviel konzentrierter Salzsäure, daß die Lösung 12% HCl enthält, und höchstens 20 Sekunden langes Erhitzen) auszuführen, wobei es sich empfehlen dürfte, den erhaltenen Farbstoff nach Rosin²⁾ spektralanalytisch zu untersuchen.

¹⁾ Monatshefte für Chem., Bd. XXV, S. 611.

²⁾ Rosin, H., Bd. XXXVIII, S. 555.

Darstellung und Analyse einiger Nucleinsäuren.

VIII. Mitteilung.

Über die Milznucleinsäure.

Von

P. A. Levene.

(Aus dem Rockefeller Institute for Medical Research.)

(Der Redaktion zugegangen am 19. Juni 1906.)

Bei der Analyse verschiedener Nucleinsäuren, soweit sie bis jetzt beschrieben sind, richtete der Verfasser seine Aufmerksamkeit auf das Studium der Komponenten ihrer Moleküle.¹⁾ Eine quantitative Schätzung der Bestandteile konnte deshalb nicht vorgenommen werden, weil von den beiden Darstellungsmethoden der Säuren, die eine die Substanz nicht in hinreichender Menge lieferte, die andere aber ein Produkt, das nicht völlig frei von Verunreinigungen war.

Im Verlaufe dieser Untersuchungen wurde nun die Beobachtung gemacht, daß Nucleinsäuren in großem Überschuß von konzentrierter Essigsäure löslich sind, und aus solchen Lösungen frei von den gewöhnlichen Verunreinigungen durch Kupferchlorid oder Salzsäure gefällt werden. Die Ausbeute war außerdem ganz zufriedenstellend und so wurde es möglich, die Frage der quantitativen Bestimmung der basischen Komponenten der Säuren in Angriff zu nehmen. In dieser Publikation sollen die Resultate der Analyse von Milznucleinsäure mitgeteilt werden.

Die Darstellung der Säure war folgende:

Die zerkleinerten Drüsen wurden ungefähr 2 Stunden in einer 5%igen Kochsalzlösung gekocht, worauf 7% des Gewichtes

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXII, S. 541; Bd. XXXI, S. 402; Bd. XXXVII, S. 402; Bd. XXXIX, S. 4; Bd. XXXIX, S. 479.

der frischen Drüse an Natriumacetat hinzugefügt wurde und die Mischung abkühlte. Darauf erfolgte Zusatz von Natronlauge und die so behandelten Drüsen wurden über Nacht stehen gelassen. Wie in früheren Mitteilungen beschrieben, wurden nun die Eiweißkörper der Drüse mit Pikrin- und Essigsäure entfernt, und im Filtrat die Nucleinsäure mit Alkohol gefällt. Nachdem die Alkoholfällung mit Natronlauge wieder aufgelöst war, wurde ein großer Überschuß von Eisessig hinzugefügt und abgesaugt. Hierauf erfolgte Fällung der Nucleinsäure mit 20%iger Kupferchloridlösung, dann Waschen und Trocknen in gewöhnlicher Weise.

Die Analyse der auf diese Weise erhaltenen Substanz gab folgende Werte:

Präparat I: 0,3584 g Substanz wurden für eine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl verwandt. Sie erforderten zur Neutralisation 38,8 ccm Schwefelsäure (1 ccm = 0,001418 g N); N = 15,35%.

0,2010 g Substanz enthielten 0,0524 g Asche = 26,07%.

0,1905 „ „ gaben 0,0660 „ $Mg_3P_2O_7$; P = 8,02.

Präparat II: 0,1378 g Substanz wurden zu einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl verwendet. Sie erforderten zur Neutralisation 13 ccm Schwefelsäure (1 ccm = 0,00162 g N); N = 15,30%.

0,1265 g Substanz gaben bei der Verbrennung 0,1632 g CO_2 und 0,0525 g H_2O ; C = 35,10%; H = 4,61%.

0,1180 g Substanz gaben 0,0310 g Asche = 26,26%.

0,1670 „ „ „ beim Schmelzen 0,0494 g $Mg_3P_2O_7$;
P = 8,27%.

0,1178 „ „ „ bei der Verbrennung 0,1502 g CO_2 und
0,0480 g H_2O ; C = 34,78%; H = 4,53%.

Wenn man das Kupfer in Rechnung zieht, war die Zusammensetzung der Säure:

| | Präparat I | Präparat II | Älteres Präparat |
|----------|------------|-------------|------------------|
| C | — | 37,78% | 36,40% |
| H | — | 4,86% | 5,10% |
| N | 16,62% | 16,51% | 17,30% |
| P | 8,99% | 8,91% | 9,03% |
| (Basen — | 7,7 % | 7,35% | 11,56%) |

Somit differierte die elementare Zusammensetzung der Säure nur wenig von derjenigen, die in meiner früheren Mitteilung angegeben war. Die Verschiedenheit erklärt sich wohl aus der Anwendung von Ammoniak bei der früheren Dar-

stellung; denn die Erfahrung hat ergeben, daß es beinahe unmöglich ist, aus der Nucleinsäure irgend ein Mineralsalz völlig zu entfernen, das im Laufe der Darstellung angewandt wurde.

Zur hydrolytischen Spaltung wurde das Kupfersalz verwendet. Zur Beurteilung des Purinbasengehaltes wurde die Säure das eine Mal in einer 2^o/igen, das andre Mal in einer 5^o/igen Schwefelsäurelösung drei Stunden lang im Autoklaven erhitzt. Da Steudel¹⁾ in seiner Mitteilung über den Abbau der Thymusnucleinsäure das Vorhandensein von vier Purinbasen im Molekül angibt, bemühte ich mich, besonders Xanthin und Hypoxanthin unter den Spaltungsprodukten der Milznucleinsäure aufzufinden, was aber nicht gelang.

Die Einzelheiten der Analyse lasse ich folgen.

64 g lufttrockenes Kupfersalz, enthaltend 45 g Säure, wurden im Autoklaven bei 125—150° C. mit 400 ccm 2^o/iger Schwefelsäure zersetzt; darauf wurde filtriert, das Filtrat mit Ammoniak neutralisiert und auf ein sehr kleines Volumen eingedampft. Die dabei entstehende Ausscheidung wurde abfiltriert und enthielt Guanin, sowie etwas Adenin und Phosphorsäure. Sie wurde in verdünnter Schwefelsäure gelöst, die Schwefel- und Phosphorsäure durch überschüssiges Baryumhydrat und dieses wieder durch Schwefelsäure entfernt. Das Filtrat vom Baryumsulfat wurde jetzt eingedampft und mit ammoniakalischer Chlorsilberlösung behandelt. Die Zersetzung des so gebildeten Niederschlages wurde durch Salzsäure bewirkt, worauf das Filtrat vom Chlorsilber mit Ammoniak neutralisiert und auf ein kleines Volumen eingedampft wurde. Nachdem das so ausgeschiedene Guanin abfiltriert war, wurde das Filtrat zu dem des ersten rohen Guaninniederschlages hinzugefügt und mit ammoniakalischer Chlorsilberlösung versetzt, worauf ich den entstandenen gelatinösen Niederschlag mit Salzsäure zersetzte. Das Filtrat vom Chlorsilber wurde nun mit Ammoniak neutralisiert und eingedampft, die vom Guanin abfiltrierte Lösung in der Hitze mit Pikrinsäure behandelt, und das Adeninpikrat abfiltriert. Aus dem Filtrat wurde die Pikrinsäure mit Schwefelsäure und Äther entfernt und dann wurden die übrigbleibenden

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 165 und Bd. XLIII, S. 402.

Purinbasen mit ammoniakalischer Chlorsilberlösung gefällt; doch bestand dieser Silberniederschlag nur aus Guanin und Adenin. Somit konnte weder Xanthin noch Hypoxanthin in nennenswerter Menge gefunden werden.

Die Ausbeute an Adeninpikrat betrug 4,5 g.

Das Guanin ging durch ein Mißgeschick verloren. In einem zweiten Versuch wurden 40 g lufttrockenes Kupfersalz, enthaltend 31 g freie Nucleinsäure im Autoklaven bei 125–160° C. mit 175 ccm 5%iger Schwefelsäure gespalten. Die Trennung der Basen erfolgte in der gleichen Weise wie vorher und die Ausbeute an Guanin betrug 0,505 g, an Adeninpikrat 2,8 g.

Die Analyse der Pyrimidinbasen erfolgte so, wie es in der vierten Mitteilung beschrieben ist.

30 g lufttrockenes Kupfersalz, enthaltend 21 g freie Säure, wurden verwandt.

Die Ausbeute betrug: Thymin 1,2 g
Cytosinpikrat 4,5 g

Das Uracil wurde nicht gewogen, da die Ausbeute im allgemeinen sehr gering ist.

| Berechnet auf 100 g | |
|---------------------|---------|
| Adeninpikrat | 8,27 g |
| Guanin | 1,62 g |
| Thymin | 5,71 g |
| Cytosinpikrat | 21,43 g |

In einer früheren Mitteilung ist gezeigt worden, daß die Beschaffenheit der Mehrzahl der Nucleinsäurekomponenten wohl bekannt ist, man aber über die Art ihrer Verknüpfung im Molekül der Säure bisher wenig weiß. Neuerdings versuchten Schmiedeberg¹⁾ und seine Schüler zu zeigen, daß die Nucleinsäure aus einer Grundsubstanz bestehe, die sie Nucleotolphosphorsäure nennen, und die mit den Purinbasen eine verhältnismäßig lockere Bindung zur Bildung des Nucleinsäuremoleküls eingeht. Vorher schon hatten Kossel und Neumann²⁾ ein purinfreies Derivat der Nucleinsäure erhalten, welches sie als Thyminsäure bezeichneten. Die Zusammensetzung dieser Thymin-

¹⁾ Arch. f. exp. Path. u. Pharm., Bd. LXIII, S. 57, 1900.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 77.

säure ist sehr wenig weiter untersucht worden und die hypothetische Nucleotinphosphorsäure konnte bisher nicht in reiner Form erhalten werden. Doch teilen alle Autoren die Ansicht, daß auf dem Wege der Spaltung in einfache kristallinische Komponenten, intermediär Produkte verschiedener Zusammensetzung gebildet werden, und das Studium solcher intermediärer Produkte scheint von großer Bedeutung für die Erweiterung unserer Kenntnisse betreffs der Bindungsart der einfachen Komponenten im Molekül der Nucleinsäure.

In einer früheren Mitteilung berichtete der Verfasser,¹⁾ daß es bei der Spaltung mit 20%iger Schwefelsäure gelingt, eine in Wasser und sehr verdünnten Säuren unlösliche Substanz zu erhalten. Diese Substanz enthielt Stickstoff, Phosphor, nur Spuren von Purin- und Pyrimidinbasen, Spuren von Furfurol gebender Substanz und nachweisbare Mengen eines Körpers, der bei weiterer Spaltung mit Mineralsäuren Lävulinsäure liefert. Ob die andern Komponenten aus dem Molekül in freiem Zustande oder miteinander vereinigt abgespalten waren, wurde nicht konstatiert. Im Laufe dieser Untersuchung sollte nun auch der Versuch gemacht werden, außer diesem schon beschriebenen Produkt noch andere komplexe Moleküle unter den durch Mineralsäuren gebildeten Spaltungsprodukten der Nucleinsäure aufzufinden. Dies geschah folgendermaßen:

Nucleinsäure wurde mit Hilfe von verdünnten Säuren in eine lösliche und eine unlösliche Fraktion gespalten. In einem Teil der löslichen Fraktion (I) wurde eine Bestimmung der Pyrimidinbasen vorgenommen, ein anderer Teil (II) wurde eingedampft und mit einer 25%igen Lösung von Schwefelsäure weitergehend gespalten, worauf in dem Reaktionsprodukt ebenfalls die Menge der Pyrimidinbasen festgestellt wurde. Wenn komplexe Moleküle in der Lösung I vorhanden waren, so hätte bei dem zweiten Versuch (in Fraktion II) die Ausbeute an Pyrimidinbasen größer sein müssen. Die Produkte der zweiten Spaltung der löslichen Fraktion wurden dann verglichen mit denen des unlöslichen Restes.

¹⁾ American Journal of Physiology, Bd. XII, S. 213, 1904.

Die Verteilung der verschiedenen Körpergruppen war die folgende:

Purinbasen.

Im wesentlichen wurden alle Purinbasen aus dem Molekül durch Erhitzen der Substanz mit 2%iger Schwefelsäure auf 150° entfernt und dies stimmt überein mit der Tatsache, daß bei der weiteren Behandlung mit 5%iger Säure die Ausbeute im wesentlichen unverändert bleibt. Die unlösliche Fraktion enthält nur Spuren dieser Basen.

Pyrimidinbasen.

Versuch I. 40 g lufttrockene Substanz, enthaltend 5,29% Phosphor, wurden im Autoklaven mit 100 ccm 25%iger Schwefelsäure vier Stunden auf 150—175° C. erhitzt. Unter den hydrolytischen Produkten fand sich Thymin und Cytosin in folgender Ausbeute:

| | |
|---------------|-------|
| Thymin | 1,2 g |
| Cytosinpicrat | 3,1 " |

Versuch II. 40 g der gleichen Substanz wurden in 250 ccm 5%iger Schwefelsäure im Autoklaven bei 125—150° C. vier Stunden lang erhitzt. Unter den Produkten der Hydrolyse wurden die Pyrimidinbasen nach der Methode von Kossel-Jones bestimmt und gaben folgende Ausbeute:

| | |
|---------------|--------|
| Thymin | 0,45 g |
| Cytosinpicrat | 1,2 " |

Versuch III. 40 g derselben Substanz wurden in der gleichen Weise wie im letzten Versuch gespalten. Die lösliche Fraktion wurde auf 100 ccm eingedampft und soviel konzentrierte Schwefelsäure hinzugefügt, daß ein Säuregehalt von 25% erzielt war. Darauf wurde die Lösung vier Stunden im Autoklaven erhitzt. Die Ausbeute an Pyrimidinbasen war

| | |
|---------------|-------|
| Thymin | 1,4 g |
| Cytosinpicrat | 2,7 " |

Versuch IV. Die bei den Versuchen II und III durch Hydrolyse mit 5%iger Schwefelsäure erhaltenen unlöslichen Rückstände wurden vereinigt und mit 25%iger Schwefelsäure

gespalten; es ergab sich kein Thymin und nur eine Spur von Basen, die ein unlösliches Pikrat bildeten.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß bei der Hydrolyse der Milznucleinsäure mit 5%iger Schwefelsäure die folgenden Reaktionen stattfinden: Praktisch werden alle Purinbasen in Freiheit gesetzt, desgleichen ein Teil der Pyrimidinbasen, während der Rest in Form eines Molekülkomplexes verloren geht. (Die Natur dieser Substanz soll in einer besonderen Mitteilung erörtert werden.) Es entsteht ein unlöslicher Körper, der frei von Purin- und Pyrimidinbasen ist.

Kohlehydrate.

In einer früheren Mitteilung war festgestellt worden, daß bei der Hydrolyse mit 2%iger Schwefelsäure ein Rückstand entsteht, der nicht mehr die Furfurol gebende Substanz enthält, jedoch bei weiterer Spaltung noch Lävulinsäure liefert. Bei der vorliegenden Untersuchung sollte nun versucht werden, festzustellen, wie die Hexose in den verschiedenen Fraktionen verteilt ist, die man bei der Hydrolyse der Milznucleinsäure mit Hilfe von verdünnten Mineralsäuren erhält, zu welchem Zwecke folgende Versuche ausgeführt wurden:

Versuch I. 10 g der auch in den früheren Versuchsreihen angewandten Substanz wurden mit 50 ccm 25%iger Schwefelsäure in einem Autoklaven bei 150° C. drei Stunden lang erhitzt. Aus den Produkten der Hydrolyse wurde dann das Silbersalz der Lävulinsäure auf die gewöhnliche Weise erhalten. Ausbeute: 0,7 g.

Versuch II. 40 g der gleichen Substanz wurden im Autoklaven bei 150° C. vier Stunden lang mit einer 5%igen Schwefelsäurelösung hydrolysiert, darauf wurde filtriert und der Rückstand mit Wasser ausgewaschen. Nach dem Eindampfen der vereinigten Filtrate und Waschwässer auf 100 ccm wurden 15 ccm konzentrierte Schwefelsäure hinzugefügt und die Lösung vier Stunden im Autoklaven bei 150° C. erhitzt. Das Silbersalz der Lävulinsäure, welches in der gewöhnlichen Weise gewonnen war, wog 3,4 g.

Versuch III. 4 g des nach der Spaltung mit 5%iger

Schwefelsäure erhaltenen, getrockneten Rückstandes wurden im Autoklaven mit 25%iger Schwefelsäure gespalten, worauf sich nur eine Spur Lävulinsäure erhalten ließ.

Versuch IV. 20 g des nach Spaltung mit 2%iger Schwefelsäure erhaltenen und getrockneten Rückstandes wurden im Autoklaven mit 25%iger Schwefelsäure gespalten und es ergaben sich nur ungefähr 0,150 g Thymin und 0,750 g Cytosinipikrat. Die Ausbeute an Silbersalz der Lävulinsäure betrug 0,5 g.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß bei der Hydrolyse mit 5%iger Schwefelsäure alle Kohlehydrate des Moleküls der Nucleinsäure sich in den löslichen Spaltungsprodukten befinden. Ob sie in freiem Zustande oder in Form eines Molekülkomplexes vorhanden sind, soll später untersucht werden. Bei der Spaltung mit 2%iger Schwefelsäure entsteht eine unlösliche Substanz, in welcher das Verhältnis von Kohlehydraten zu Pyrimidinbasen größer als in der ursprünglichen Säure ist, obgleich die absolute Ausbeute an Lävulinsäure niedriger ist, als die bei der Hydrolyse der Nucleinsäure erhaltene.

Melanin.

Bei der Hydrolyse von Nucleinsäuren mit starken Mineralsäuren erhält man Substanzen, die wohl als Melanine zu betrachten sind. Dieser Substanz haben Schmiedeberg, Osborne und Harris ihre Aufmerksamkeit zugewandt.¹⁾ Die Substanz des ersten Untersuchers enthielt Phosphor, die von Osborne und Harris beschriebene war frei davon. Den Ursprung der Substanz dachte man sich in der Weise, daß sie durch Kondensation aus den Spaltungsprodukten von Purinbasen und Kohlehydraten entstanden sei.

Im Laufe der gegenwärtigen Untersuchung ergaben sich folgende Beobachtungen:

Versuch I. 40 g der bei der ersten und zweiten Versuchsreihe verwendeten Substanz wurden mit 5%iger Schwefelsäure gespalten. Der lösliche Teil wurde nun eingedampft und mit 25%iger Schwefelsäure weiter erhitzt. (Diese Fraktion

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVI, S. 83, 1902.

enthielt, wie aus der ersten und zweiten Versuchsreihe zu entnehmen ist, alle Kohlehydrate, sowie die Purin- und Pyrimidin-derivate des Nucleinsäuremoleküls.) Die Ausbeute an Melanin war in dieser Fraktion sehr unbedeutend.

Versuch II. 4 g des getrockneten Rückstandes, der bei der Hydrolyse mit 5%iger Schwefelsäure erhalten war, wurde der weiteren Zersetzung und zwar mit 25%iger Schwefelsäure unterworfen. Der Erfolg war die Bildung von 1,8 g Melanin, frei von Phosphor und unlöslich in Alkalien und Säuren.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß Melanin und sein phosphorhaltiger Vorläufer entweder aus denjenigen Bestandteilen der Nucleinsäure entstehen, die weder Purinbasen noch Kohlehydrate sind, oder aber, daß sie durch Kondensation aus den Spaltungsprodukten der Kohlehydrate und Purinbasen gebildet werden. In letzterem Falle müßte die Kondensation einfach beim Erhitzen mit 5%iger Schwefelsäure stattfinden.

Um mehr Klarheit über den Prozeß der Melaninbildung zu bekommen, schien es ratsam, die Zusammensetzung der beiden Vorstufen — nämlich des Rückstandes nach Hydrolyse mit 2%iger Schwefelsäure und des anderen nach Spaltung mit 5%iger Schwefelsäure — mit der des Melanins und der der ursprünglichen Nucleinsäure zu vergleichen. Es wurde also die Aufmerksamkeit den Spaltprodukten der beiden Muttersubstanzen des Melanins zugewandt. Sie sowohl wie das Melanin enthielten Kupfer und somit schien es zweckmäßig, die Vergleiche mit dem Kupfersalz der Nucleinsäure anzustellen.

Die Resultate der Analyse waren folgende:

I. Rückstand nach Hydrolyse mit 2%iger Schwefelsäure:

0,2220 g Substanz wurden zu einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl verwendet; sie erforderten 29,6 ccm Schwefelsäure zur Neutralisation (1 ccm Säure = 0,00124 g N); N = 16,53%.

0,3380 g Substanz wurden zu einer Phosphorbestimmung verwendet. Sie gaben 0,0224 g $Mg_3P_2O_7$; P = 1,85%.

0,2352 g Substanz gaben 0,0682 g Asche = 29%.

0,2396 „ „ „ bei der Kupferbestimmung 0,0690 g CuO;
Cu = 21,75%.

II. Rückstand nach Hydrolyse mit 5%iger Schwefelsäure:

0,2683 g Substanz wurden zu einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl verwendet. Sie erforderten 48,2 ccm der Schwefelsäure des vorigen Versuches. N = 22,29%.

0,2099 g Substanz lieferten 0,666 g Asche = 31,25%.

0,2863 g Substanz wurden zu einer Phosphorbestimmung verwendet. Die Ausbeute war sehr gering.

0,1925 g Substanz gaben bei der Kupferbestimmung 0,0640 g CuO; Cu = 19,05%.

III. Melanin:

0,2730 g Substanz erforderten bei einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl 22,6 ccm der Schwefelsäure der vorigen Versuche. N = 10,28%.

0,2894 g Substanz lieferten 0,0590 g Asche = 20,39%

0,2200 g Substanz lieferten bei der Phosphorbestimmung keine Ausbeute.

0,2700 g Substanz lieferten bei der Kupferbestimmung 0,0536 g Kupferoxyd. Cu = 15,87%.

In der folgenden Tabelle sind zum Vergleiche die Analysenresultate der vorherigen Substanzen und die der Nucleinsäure zusammengestellt; daneben findet sich die Zusammensetzung einer Substanz, die durch Hydrolyse einer freien Nucleinsäure (nicht des Kupfersalzes) mit 2%iger Schwefelsäure entsteht. Sie ist in einer früheren Mitteilung beschrieben.

| | Nucleinsäure | Rückstand I
(Cu-Salz) | Rückstand I
(freie Säure) | Rückstand II | Melanin |
|-------|--------------|--------------------------|------------------------------|--------------|---------|
| N | 15,35 % | 16,53 % | 8,83 % | 22,29 % | 10,28 % |
| P | 8,10 % | 1,85 % | 8,62 % | wenig | 0 |
| Cu | — | 21,75 % | — | 19,05 % | 15,87 % |
| Asche | 26,0 % | 29,0 % | 39,0 % | 31,25 % | 20,39 % |

Somit findet bei der hydrolytischen Bildung der Muttersubstanz des Melanins aus der Nucleinsäure zuerst eine Steigerung des Stickstoffgehaltes statt. Dem folgt ein Absinken des Stickstoffes im Melanin; auch ist eine allmähliche Abspaltung von Phosphor zu verzeichnen. Der Kupfergehalt zeigt eine Erhöhung in den Muttersubstanzen des Melanins, weniger im Melanin selbst.

Um über die Natur der Spaltungsprodukte der Vorstufen des Melanins näheres zu erfahren, werden folgende Versuche angestellt:

20 g trockene Substanz vom Rückstand I wurden mit 25%iger Schwefelsäure im Autoklaven bei 150—175° C. gespalten. In einem Teil des Filtrates wurde die Stickstoffmenge bestimmt und der Stickstoff der nichtbasischen Substanzen aus dem des Filtrates einer Phosphorwolframsäurefällung berechnet. Die Bestimmung des Ammoniaks geschah nach einer von Dr. Stookey und dem Verfasser¹⁾ angegebenen Methode.

4 g der getrockneten Substanz vom Rückstand II wurden in der gleichen Weise behandelt.

Die Verteilung des Stickstoffes ergab sich wie folgt:

| | Rückstand I | Rückstand II |
|------------------|--------------------|--------------------|
| Gesamt-N | 1,90 g | 0,445 g |
| Ammoniak-N | 13,5% des Gesamten | 23,6% des Gesamten |
| Basisches N | 40,5% | 65,8% |
| Nichtbasisches N | 45,5% | 10,68% |

Es wurde schon erwähnt, daß der Rückstand I bei der Hydrolyse Lävulinsäure lieferte, ferner etwas Thymin und eine Base, die ein unlösliches Pikrat bildete.

Bei der Spaltung des Rückstandes II konnte weder Lävulinsäure noch Thymin erhalten werden und nur 0,250 g eines unlöslichen Pikrates.

Es ist bemerkenswert, daß bei der Hydrolyse der freien Nucleinsäure (anstatt des Kupfersalzes) mit 2%iger Schwefelsäure²⁾ eine Substanz mit 11,33% Phosphor erhalten wird, während das Kupfersalz unter den gleichen Bedingungen einen Körper mit 2,45% Phosphor und mit 21,75% Kupfer liefert. Das weist auf die Tatsache hin, daß jene Kondensation schon stattgefunden hat. Auch ist es bemerkenswert, daß aus dem Melanin das Kupfer weder mit Ammoniak noch mit Salzsäure entfernt werden kann, somit also in einer noch stabileren Form als in der eines Salzes vorhanden zu sein scheint.

¹⁾ Journal of Medical Research, Bd. V (neue Folge), S. 455, 1903.

²⁾ American Journal of Physiology, Bd. XII, S. 213, 1904.

Zum Verdauungschemismus im tierischen Organismus unter physiologischen und pathologischen Verhältnissen.

I. Mitteilung.

Von

E. S. London.

(Aus der Abteilung für allgemeine Pathologie des K. Instituts für experimentelle Medizin zu St. Petersburg.)

(Der Redaktion zugegangen am 22. Juni 1905.)

Dank den Untersuchungen der letzten Zeit (Pawlowsche Schule u. a.) hat die Physiologie der Verdauung bedeutende Fortschritte gemacht, so daß es mir an der Zeit schien, auch für das Studium der Pathologie der Verdauung die neuen Untersuchungsmethoden in Anwendung zu bringen. Im Sinne dieser Aufgabe führte ich in Gemeinschaft mit A. Sokoloff¹⁾ meine Untersuchungen: «Über den Einfluß von Blutentziehungen auf die Magenverdauung» aus. Außerdem untersuchte ich noch die Magensekretion bei Inanition und Fieber. Die dabei erzielten Resultate waren klar und unzweideutig; sie gewährten mir aber nicht volle Befriedigung, weil ich doch nur über eine Seite der Frage Aufklärung bekam, d. h. über die Saftabsonderung und nicht über die andere, und zwar über den Gang des Verdauungsprozesses selbst. Weil wir aber über diesen Prozeß im normalen Organismus noch wenig Kenntnisse besitzen, so lag der Wunsch nahe, denselben zunächst möglichst klar zu stellen.

Es mußte natürlich vor allem für eine geeignete Methodik gesorgt werden.

Am zweckmäßigsten mußte sich eine solche Methode erweisen, welche gestattete, beim Versuchstier an beliebiger Etappe des Verdauungstraktus die passierenden Massen aufzufangen und zu analysieren. Hierzu war ein Tier erforderlich mit an ver-

¹⁾ Zentralblatt für Physiologie, 1903, Heft 7.

schiedenen Stellen des Verdauungskanal's derart angelegten Fisteln, daß aus denselben die bis dahin durch Peristaltik beförderten Massen in voller Menge in ein untergestelltes Gefäß herausfallen konnten. Die Analyse der an den verschiedenen Stellen successive aufgefangenen Verdauungsgemeinschaft, welche von einer bestimmten, dem Tiere dargereichten Nahrung stammen, müssen unter solchen Bedingungen über den Gang des Verdauungsprozesses Aufklärung bringen.

An jeder einzelnen Stelle des Verdauungstraktus stellt das Inhaltsquantum, welches sich genau bestimmen läßt, die Differenz dar zwischen der eingenommenen Nahrung und dem resorbierten Teile der Verdauungsprodukte. Der letztere läßt sich leicht aus den zwei ersteren berechnen. Wenn uns also die Zusammensetzung der eingenommenen Nahrung, des resorbierten Teiles derselben, sowie des noch der Verdauung, Resorption und Ausscheidung harrenden Restes bekannt ist, so erlangen wir die Möglichkeit, den funktionellen Wert jedes einzelnen Abschnittes des Verdauungstraktus zu eruieren.

Bei einem Hunde mit mehreren Fisteln mußte es weiter möglich sein, durch Analyse des in eine Fistel eingeführten und aus einer anderen wieder entnommenen Materials die funktionellen Werte des betreffenden Abschnittes des Verdauungskanal's noch insbesondere genauer zu bestimmen.

Wie wichtig es auch wäre, an solchen Hunden zu experimentieren, so schien es mir doch zweckmäßiger, das Studium mit Einfistelhunden anzufangen und zwar mit einem Hunde, dem eine Magenfistel (Magenfistelhund) angelegt worden war, einem Hunde mit einer Fistel am Beginn des Duodenum gleich hinter dem Pylorus (Pylorusfistelhund), einem Hunde mit einer Fistel an der Grenze zwischen Duodenum und Jejunum (Duodenumfistelhund), einem mit einer Fistel ungefähr in der Mitte des Dünndarms (Jejunumfistelhund) und einem Hunde mit einer Fistel dicht vor dem Coecum (Ileumfistelhund).

An solchen Hunden sind unsere bisherigen Versuche ausgeführt und weitere in Aussicht genommen worden.

Die Resultate der entsprechenden Versuche sollen im Laufe der Zeit von den an ihnen Beteiligten zur Mitteilung gebracht

werden. An dieser Stelle möge es genügen, die Grundprinzipien der Operationstechnik und die allgemeine Versuchsanordnung mitzuteilen.

I. Der Durchmesser der Magenfistelkanüle muß die Dicke des Kleinfingers des Experimentators ein wenig übertreffen, um die Exploration des Magens und die Entleerung desselben zu ermöglichen. Bei allen Darmfisteln aber muß eine möglichst breite (1,8—2,3 cm) Kanüle angelegt werden.

II. Der Rand der Fistelkanüle. Die Breite des Ringes am inneren Rande wird bei der Magenfistelkanüle am besten gleich 1 cm gewählt werden, bei der Darmfistelkanüle gleich 0,5 cm. Was den äußeren Rand der Kanülen anbetrifft, so hat die Breite seines Ringes bei Magen- und Jejunumfisteln keine besondere Bedeutung, bei Duodenalfisteln aber muß sie möglichst groß (2 cm und mehr) sein, um dem Überwachsen der Fistelkanüle durch die umliegende Haut vorzubeugen. Bei der Ileumfistel muß man darauf achten, daß der äußere Ring keinen Druck auf die Genitalia externa (bei Männchen) ausübt.

III. Die Einführungsart der Kanüle. Bei der Magenfistel wird das Röhrchen im Laparotomieschnitte fixiert; bei allen übrigen Fisteln muß man für dasselbe vermittelt eines Skalpells eine spezielle Öffnung von genau berechneter Dimension parallel dem Laparotomieschnitt anlegen. Die Länge der Spezialöffnung für die Kanüle muß $\frac{\pi D}{2}$ (D-Durchmesser der Kanüle)

betragen. Handelt es sich um eine Jejunum- oder Ileumfistel, so erzielt man einen sicheren Erfolg nur in dem Falle, wenn man die Kanüle durch einen Schnitt im Omentum majus durchzieht, bevor man sie in die für sie bestimmte Bauchdeckenöffnung einführt.

IV. Die Befestigung des äußeren Ringes der Kanüle. Bei Magenfistelkanülen ist der äußere Ring schon vor der Operation an das Rohr angelötet und bietet angesichts der weiten Operationswunde kein Hindernis für seine Fixierung. Bei den Darmfisteln aber muß der äußere Ring erst gleich nach der Operation angefügt werden und zwar bei Duodenalfisteln durch einfaches Anlöten, bei Jejunum- und Ileumfisteln durch

Aufziehen eines starken Gummiringes über denselben auf den freien Rand des Kanülenrohres, nachdem die Ringscheibe über denselben bis an die Bauchwand herangeführt worden ist. Hierdurch wird erreicht, daß der Gummireif der Ringscheibe bei Reaktionsschwellungen ein Nachgeben gestattet. Es kann auch in diesem Falle das Anlöten des Ringes erst am 7.—10. Tage nach der Operation erfolgen.

Alle erwähnten Operationen führen bei geeigneter Technik sicher zum Ziele. Die Tiere erholen sich schnell und können mehrere Jahre zu Experimenten dienen.

Die Versuchsanordnung ist folgende. Nachdem die Hunde 48 Stunden gehungert und einige Zeit (5—10 Min.) mit geöffneten Fistelkanülen zwecks Beobachtung der Ausscheidungen (ausgenommen der Magenfistelhund, bei dem nach der Untersuchung des Magens die Fistel geschlossen wird) im Gestell gestanden haben, bekommen sie alle gleichzeitig eine qualitativ und quantitativ gleiche Nahrung. Unter der Fistel wird ein mit Eis oder Schnee gefülltes Gefäß und darin ein Rezipient mit einem Stück Eis, welches nach Bedarf erneuert wird, aufgestellt. Auf diese Weise gelingt es, das erhaltene Gemenge von vornherein bei 1—3° C. aufzubewahren und seine weitere Verdauung zu verhindern. Der Versuch wird abgeschlossen, wenn sich binnen $\frac{1}{2}$ —1 Stunde keine Verdauungsgemenge mehr zeigen.

Handelt es sich um eine Magenfistel, so wird dieselbe zur gewünschten Zeit geöffnet, der aus ihr entleerte Mageninhalt aufgenommen und der Rest aus dem Magen mit Wasser ausgewaschen.

Darauf folgt die qualitative und quantitative Analyse der dargereichten Nahrung und der aufgefangenen Gemenge.

Die qualitativen Resultate sind bei einem derart zusammengesetzten Versuche an einfisteligen Hunden von den individuellen Beschaffenheiten der einzelnen Tiere unabhängig. Was aber die quantitativen Verhältnisse betrifft, so müssen diese beim Versuche an mehrfisteligen Hunden noch an Genauigkeit gewinnen.

Die aufgenommenen Massen enthalten selbstverständlich außer dem Verdauungsobjekt auch noch verschiedene Verdauungssäfte, wie Speichel, Galle, Magen-, Pankreas- und Darmsaft. Einerseits erschweren diese natürlich gewissermaßen die Analyse, andererseits aber gewähren sie bei unseren Studien über die Verdauungsprozesse gleichzeitig einen Einblick in die Absonderungsverhältnisse dieser Säfte.

Wir sind uns bewußt, daß bei unserer Versuchsanordnung, welche einzelne Abschnitte des Verdauungskanals von der Verdauungsarbeit während des Versuches ausschließt, auch ein Teil der vorauszusetzenden Wechselwirkung dieser Arbeit auf die vorhergehenden Abschnitte fortfallen muß; wir hoffen aber, auch über diese Frage durch geeignete Versuchsanordnungen mit der Zeit Aufschluß zu erlangen.

Über die Verbreitung von Glukothionsäure in tierischen Organen.

Von

John A. Mandel und P. A. Levene.

(Aus dem chemischen Universitätslaboratorium und dem Bellevue-Krankenhaus des
Medical-College in New-York.)

(Der Redaktion zugegangen am 24. Juni 1905.)

Gepaarte Schwefelsäureverbindungen kohlehydratartiger Substanzen wurden zuerst von C. Mörner und Schmiedeborg aufgefunden. Später bemühten sich dann Schmiedeborgs Schüler, Krawkow¹⁾ und Oddi,²⁾ die Verbreitung solcher Körper im Organismus näher zu erforschen, und es gelang ihnen auch ihre Darstellung aus verschiedenen Bindegewebssubstanzen. Da nun einer³⁾ von uns das Vorkommen einer der in Frage stehenden ähnlichen Substanz in einem parenchymatösen Organe, nämlich in der Milz, erweisen konnte, so lag es nahe, auch in andern derartigen Organen danach zu suchen, und wir entschlossen uns, die Niere, die Leber, das Pankreas und die Milchdrüse nach dieser Richtung zu prüfen. In der Tat war bei jedem der genannten Organe unsere Untersuchung von Erfolg begleitet, doch soll gleich hier bemerkt werden, daß die Ausbeute an reiner Substanz meist sehr gering ausfiel, da die Reinigung große Verluste mit sich brachte.

Darstellungsverfahren.

Die Säure läßt sich nach derselben Methode, wie sie bei der Milz angewendet wurde, auch aus den andern Organen gewinnen; nur erhält man dabei eine Substanz, die noch mit Spuren von Eiweiß und Nucleinsäure verunreinigt ist. Um sie

¹⁾ Archiv f. exp. Pathologie u. Pharmakologie, Bd. XL.

²⁾ Archiv f. exp. Pathologie u. Pharmakologie, Bd. XXXIII.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 400.

davon zu befreien, bedient man sich eines Verfahrens, das auf ihrer Unlöslichkeit in Eisessig und der Löslichkeit in Wasser beruht; durch jene nämlich gelingt eine Abtrennung des Eiweißes und durch Auflösen in Wasser wird die Nucleinsäure beseitigt. — Es folgen die genaueren Vorschriften:

Nachdem die Organe auf dieselbe Weise, wie bei der Darstellung der Nucleinsäure angegeben, behandelt sind, hat man in der Alkoholfällung der Pikrinsäurefiltrate hauptsächlich Nucleinsäure und Glukothionsäure. Diesen Niederschlag nun löst man mit Lauge, macht mit Essigsäure stark sauer, filtriert mit Hilfe der Saugpumpe und entfernt aus dem so gewonnenen Filtrat die Nucleinsäure mit Kupferchlorid. Das noch in Lösung befindliche Kupfersalz der Glukothionsäure wird jetzt mit Alkohol ausgefällt, der Niederschlag in verdünnter Salzsäure wieder aufgelöst und nochmals mit Alkohol gefällt. Jetzt fällt die Säure frei von Kupfer aus.

Um die dem Präparat noch anhaftenden Beimengungen von Eiweiß und Nucleinsäure zu beseitigen, verreibt man es in der Reibschale innig mit Eisessig, saugt diesen ab, löst den Rückstand in Wasser und fällt, nach nochmaligem Absaugen, die wässrige Lösung mit Alkohol.

Auf diese Weise hergestellte Substanzen sind biuretfrei und enthalten Nucleinsäure nicht einmal in Spuren; dabei stimmen sie in allen ihren Eigenschaften mit der Glukothionsäure aus der Milz überein. Das Verhalten gegen Jodlösung ist allerdings bei den Präparaten verschiedener Organe ein abweichendes und gelegentlich erhält man beim Eintragen von trockener Substanz in eine hellgelbgefärbte Jodlösung einen tiefbraunen Farbenton, während man dies mit gelöster Substanz fast nie erreicht. In den Fällen, wo eine solche Braunfärbung eintritt, muß man wohl an eine Verunreinigung mit Spuren von Glykogen denken.

Ferner geben die Präparate auch in gleicher Weise, wie die Glukothionsäure der Milz, beim Kochen mit Orcinsalzsäure eine prachtvolle Violettfärbung und der amyalkoholische Extrakt einer solchen Lösung liefert die typischen Absorptionserscheinungen. Des weiteren ist zu bemerken, daß man mit

Phloroglucinsalzsäure einen roten Farbenton erhält und in Übereinstimmung damit nach Behandlung mit Salzsäure im Destillat Furfurol auf die übliche Weise nachweisen kann.¹⁾ Reduktion von Fehlingscher Lösung tritt nach Erhitzen mit Mineralsäuren ein, bleibt jedoch, ohne daß dies vorhergegangen ist, aus. Eine nähere Prüfung ergab, daß nach vorheriger Hydrolyse mit 20/oiger Schwefelsäure das Filtrat Fehlingsche Lösung mit der Stärke einer 24,50/oigen Traubenzuckerlösung reduzierte.

Erwähnt ist ja schon das Verhalten der Substanzen gegen Wasser, verdünnte Säuren, Alkalien, worin sie löslich ist, und gegen Eisessig, in dem sie sich nicht löst. Bemerkt sei noch, daß das Baryumsalz in 500/oigem Alkohol fast unlöslich ist.

Mit Hilfe des oben angegebenen Verfahrens gelangt man im allgemeinen zu reinen Präparaten, doch stößt man bei gewissen Organen auf Schwierigkeiten, die wir in der nun folgenden näheren Schilderung der Substanzen verschiedener Herkunft bei Gelegenheit der betreffenden Fälle besprechen werden.

Milchdrüse.

Hier gelingt eine völlige Reindarstellung. Ich lasse die Analysen von verschiedenen Präparaten folgen.

Präparat I.

0,2293 g Substanz gaben nach Kochen mit Salzsäure und Zusatz von Chlorbaryum 0,0448 g $\text{BaSO}_4 = 2,68\%$ S.

0,1757 g Substanz wurden zu einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl verwendet; verbraucht: 5,05 ccm Schwefelsäure (1 ccm dieser Schwefelsäure entsprach 0,00172 g N). N = 4,66%.

¹⁾ In meiner Mitteilung über die Milz-Glukothionsäure (Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 400) habe ich angegeben «Beim Destillieren mit Salzsäure konnte man im Destillate Furfurol mit Phloroglucin, Orcin und essigsaurem Anilin nachweisen». Darüber äußert sich Neuberg wie folgt: «Die Angabe Levenes, nach der Destillation seiner Substanzen mit HCl im Destillat Furfurol nachgewiesen und positive Orcin- oder Phloroglucinprobe erhalten zu haben, ist mit den Tatsachen überhaupt nicht in Einklang zu bringen, da Furfurol, und nur solches kann sich im Destillat befinden, die Pentosenreaktionen nicht gibt» (Ascher und Spiros Ergebnisse, Bd. III, S. 404, 1904). Meine Angabe enthält jedoch, wie man sieht, kein Wort über die Pentosenreaktionen; ich habe nur sagen wollen, daß sich aus dem Destillat ein Phloroglucid, Orcid und Anilid des Furfurols darstellen läßt. P. A. L.

Präparat II.

0,1682 g Substanz gaben nach Kochen mit Salzsäure und Zusatz von Chlorbaryum 0,0356 g $\text{BaSO}_4 = 2,91\%$ S.

0,2294 g Substanz wurden zu einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl verwendet; verbraucht: 6,2 ccm Schwefelsäure. N = 4,38%.

Präparat III.

0,2185 g Substanz gaben 0,0396 g $\text{BaSO}_4 = 2,49\%$ S.

0,2492 g Substanz wurden zu einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl verwendet; verbraucht 6,6 ccm Schwefelsäure. N = 4,29%.

Präparat IV.

0,2294 g Substanz gaben 0,0449 g $\text{BaSO}_4 = 2,68\%$ S.

0,2294 g Substanz erforderten bei einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl 6,4 ccm Schwefelsäure. N = 4,52%.

Präparat V.

0,2395 g Substanz gaben 0,0431 g $\text{BaSO}_4 = 2,47\%$ S.

0,2395 g Substanz erforderten bei einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl 5,9 ccm Schwefelsäure. N = 3,99%.

Baryumsalz der Glukothionsäure.

Präparat I.

0,2125 g Substanz gaben 0,0528 g $\text{BaSO}_4 = 3,41\%$ S.

0,2647 g Substanz erforderten bei einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl 5,2 ccm Schwefelsäure. N = 3,18%.

0,1699 g Substanz gaben nach dem Kochen mit Salzsäure und darauf folgendem Zusatz von Schwefelsäure 0,0308 g $\text{BaSO}_4 = 10,66\%$ Ba.

Präparat II.

0,2454 g Substanz gaben 0,0656 g $\text{BaSO}_4 = 3,67\%$ S.

0,2694 g Substanz erforderten bei einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl 5,2 ccm Schwefelsäure. N = 3,13%.

0,2218 g Substanz gaben nach dem Kochen mit Salzsäure und darauf folgender Behandlung mit Schwefelsäure $\text{BaSO}_4 = 9,53\%$ Ba.

Präparat III.

0,3158 g Substanz gaben 0,0777 g $\text{BaSO}_4 = 3,38\%$ S.

0,3603 g Substanz erforderten für eine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl 7,2 ccm Schwefelsäure. N = 3,24%.

0,2034 g Substanz gaben nach dem Kochen mit Salzsäure und darauf folgender Behandlung mit Schwefelsäure 0,0336 g $\text{BaSO}_4 = 9,23\%$ Ba.

| Präparat | S% | N% |
|----------|------|------|
| I. | 2,68 | 4,66 |
| II. | 2,91 | 4,38 |
| III. | 2,49 | 4,29 |
| IV. | 2,68 | 4,58 |
| V. | 2,47 | 3,99 |
| Mittel | 2,65 | 4,38 |

| Präparat | Baryumsalz. | | |
|----------|-------------|------|-------|
| | S% | N% | Ba % |
| I | 3,41 | 3,18 | 10,66 |
| II | 3,67 | 3,13 | 9,53 |
| III | 3,38 | 3,24 | 9,23 |
| Mittel | 3,48 | 3,18 | 9,81 |

Um über die Natur der Kohlehydratgruppe einigen Aufschluß zu bekommen, destillierten wir zuerst mit Salzsäure vom S. G. 1,06, erhielten aber nur eine geringe Ausbeute an Furfurol-Phloroglucid. Dann wurde die Gewinnung eines Osazons versucht. Zu diesem Zwecke erhitzen wir 1,5 g Substanz im Autoklaven mit 2%iger Schwefelsäure drei Stunden auf 125° C. Nach Beseitigung der Schwefelsäure durch Baryt und dessen Überschuß mit Kohlensäure wurde das Filtrat bei vermindertem Druck eingedampft, der Rückstand in Alkohol gelöst und filtriert. Aus dem Filtrat, das wir wieder eindampften, gelang es uns dann, auf die übliche Weise ein Osazon vom Schmelzpunkt 196° C. (korr.) zu gewinnen.

Niere.

Auch bei diesem Organ gelangt man ohne Schwierigkeiten zu einem reinen Präparat. Die Analyse ergab folgende Werte:

0,2401 g Substanz gaben 0,0697 g BaSO_4 = 3,94% S.
 0,2401 g Substanz erforderten bei einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl 7,4 ccm Schwefelsäure. N = 4,99%.

Pankreasdrüse.

Hier stößt man bei der Darstellung der Glukothionsäure auf Hindernisse, die wohl vor allem auf dem gleichzeitigen Vorhandensein einer in Wasser ziemlich löslichen Nucleinsäure beruhen. So waren denn die meisten der gewonnenen Präparate mit Nucleinsäure verunreinigt, und nur einmal glückte die Darstellung eines Körpers, dessen Zusammensetzung mit der früherer Präparate aus anderen Organen gut übereinstimmte. Wir hoffen indessen, unsere Methode noch soweit zu vervollkommen, daß auch aus dem Pankreas ohne Schwierigkeit die in Frage stehende Substanz gewonnen werden kann. Hier sei nur noch bemerkt, daß uns der bedeutende Schwefelgehalt der Körper auffiel,

sowie ihr Vermögen, nach Erhitzen mit Salzsäure Fehlingsche Lösung zu reduzieren, eine Erscheinung, die bei freien Nucleinsäuren ja meist vermißt wird.

Die Analyse ergab:

Präparat I.

0,1567 g Substanz gaben 0,0277 g BaSO_4 = 2,43% S.

0,1567 g Substanz erforderten bei einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl 4,5 ccm Schwefelsäure. N = 4,65%.

Präparat II.

0,4468 g Substanz gaben 0,0854 g BaSO_4 = 2,67% S.

0,4468 g Substanz erforderten bei einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl 23 ccm Schwefelsäure. N = 8,34%.

Präparat III.

0,3060 g Substanz gaben 0,0630 g BaSO_4 = 2,83% S.

0,3060 g Substanz erforderten bei einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl 18,1 ccm Schwefelsäure. N = 9,58%.

Leber.

In diesem Falle konnte das normale Organ nicht zur Darstellung verwandt werden, da man stets anstatt der Glukothionsäure anscheinend reines Glykogen erhielt. Dies mußte also vorher entfernt werden, was wir auf folgende Weise versuchten: Wir behandelten hungernde Hunde nach der Methode von Lusk mit Phloridzin, töteten sie nach drei Tagen und behandelten die Leber nun in der üblichen Weise; dadurch kamen wir schließlich zu Präparaten, deren Menge aber nur ausreichte, sie qualitativ als Glukothionsäure zu identifizieren. Zur Gewinnung größerer Quantitäten mußte ein anderes Verfahren eingeschlagen werden, bei dem die Vorbereitung des Organes durch Autolyse geschah; wir geben hier die Resultate zweier derartiger Versuche.

Versuch I. Nach vorausgegangener 5tägiger Autolyse der Lebersubstanz gelangten wir zu einem Präparat mit folgenden Analysenwerten:

0,1882 g Substanz gaben 0,0194 g BaSO_4 = 1,42% S.

0,1882 g Substanz erforderten bei einer Bestimmung des Stickstoffs nach Kjeldahl 3,15 ccm Schwefelsäure. N = 2,71%.

Das Baryumsalz, welches wir zur Reinigung darzustellen suchten, war leider nicht frei von Glykogen zu bekommen.

Versuch II. Hier wurde erst nach 14tägiger Autolyse der Lebersubstanz an die Darstellung gegangen, wonach sich Präparate mit folgenden Analysenwerten ergaben:

0,4106 g Substanz gaben 0,1103 g BaSO_4 = 3,69% S.

0,4106 g Substanz erforderten bei einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl 12,5 ccm Schwefelsäure. N = 4,93%.

Bei dieser Gelegenheit möchten wir nicht unerwähnt lassen, daß schon früher in der Leber Substanzen beobachtet worden sind, die der Glukothionsäure nahe stehen, wir meinen das stickstoffhaltige Kohlehydrat von Seegen und Seegen und W. Niemann¹⁾ sowie die Glukoalbumose Simons,²⁾ die beide mit unserer Säure anscheinend verwandt sind.

Neben der weiteren Verfolgung dieses Zusammenhanges wäre es interessant, auch die Frage nach dem Residuum-Glykogen von neuem zu bearbeiten. Es ist dies eine Substanz, die in verschiedenen Organen nach längerem Hungern wie auch nach Konvulsionen angetroffen wird, und bisher immer mit Glykogen identifiziert wurde. Wir halten es aber nicht für ausgeschlossen, daß Verunreinigungen mit Glukothionsäure³⁾ vorlagen, wenn es sich dabei nicht überhaupt um reine Glukothionsäure gehandelt hat. Wir hoffen, diese Frage in nächster Zeit beantworten zu können.

¹⁾ Seegen, Arch. f. (Anat. u.) Physiol., 1903.

Seegen und Niemann, Wiener Sitzungsbericht d. kais. Akad. d. Wissensch. Mathem. naturw. Klasse 112, Abt. III, 119—139.

²⁾ O. Simon, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm., Bd. XLIX.

³⁾ Ein Präparat von Glykogen, das wir nach dem Verfahren von Pflüger dargestellt hatten, enthielt Spuren von organischem Schwefel.

Beitrag zur Kenntnis der Cystinurie.

Von

Eyvind Bødtker.

(Der Redaktion zugegangen am 27. Juni 1905.)

I.

Vor mehreren Jahren machte ich eine vorläufige Mitteilung¹⁾ über einen Fall von Cystinurie, dessen chemische Verfolgung mir von Herrn Professor Dr. med. Torup übertragen worden war. Meine Untersuchungen wurden Stellenwechsels halber unterbrochen, waren aber schon zu einem gewissen Abschlusse geführt, und da deren Ergebnisse vielleicht einiges an Interesse darbieten, werde ich jetzt, obgleich spät, darüber berichten.

Das Cystin, das «Blasenoxyd» von Wollaston, ist im Laufe des vergangenen Jahrhunderts schon mehrfach der Gegenstand für Untersuchungen gewesen. Die ältere Geschichte dieses eigentümlichen Körpers ist schon in dieser Zeitschrift²⁾ so eingehend behandelt, daß ich darauf näher einzugehen nicht nötig habe. Nur möchte ich einen Irrtum³⁾ bezüglich der Feststellung seiner Zusammensetzung berichtigen. Der Verdienst, diese richtig erkannt und bestimmt zu haben, gebührt nämlich unabgekürzt meinem Landsmanne Thaulow,⁴⁾ der im Jahre 1838 auf Veranlassung von Liebig und in dessen Laboratorium zu Gießen das Cystin analysierte und gleich seine richtige empirische Formel, $C_6H_{12}N_2S_2O_4$, aufstellte.

¹⁾ Norsk Magazin für Laegevidenskaben, 1892.

²⁾ Brenzinger, Bd. XVI, S. 552.

³⁾ loc. cit.

⁴⁾ Liebigs Annalen, Bd. XXVII, S. 197.

Die störende Wirkung des Cystins im Organismus beruht bekanntlich auf seiner Schwerlöslichkeit. Es bildet leicht Konkreme, die namentlich zu Beschwerden in den Harnaussführorganen Veranlassung geben und schließlich das völlige Zugrundgehen der Nieren bewirken können.

Daß das Cystin im Organismus durch Eiweißabbau entsteht, war schon von vornherein durch seinen Stickstoff- und Schwefelgehalt gegeben. Aber wie war sein Entstehen aufzufassen? War es als das Produkt pathologischer Vorgänge gebildet, oder war es einem physiologischen Prozesse entsprungen? Die erste Auffassung war jedenfalls anfangs die allgemeine, und eine sehr plausible Begründung hierfür wurde von Baumann und v. Udranszky¹⁾ gegeben. Die genannten Forscher fanden nämlich im Harn und in den Faeces eines Cystinpatienten Fäulnisalkaloide, Cadaverin und Putrescin, und da dieser Befund kurz nachher von Stadthagen und Brieger²⁾ bei einem anderen Falle von Cystinurie bestätigt wurde, war eine nahe Beziehung in der Genesis des Cystins und der Ptomaine sehr wahrscheinlich. Das Cystin, oder richtiger eine unoxydierte Muttersubstanz desselben, könnte neben den Ptomainen durch die Tätigkeit der Mikroben des Darms gebildet sein. Auf Grund eines oxydativen Vorganges könnte nun das Cystin gebildet werden und in den Harn gelangen, gerade so wie Indol und Skatol als Indoxyl und Skatoxyl in den Harn übergehen. Kurz nachher fand aber Külz,³⁾ daß das Cystin ohne Mitwirkung von Bakterien bei der Pankreasverdauung der Eiweißkörper entsteht, und die neueren Untersuchungen⁴⁾ haben dargetan, daß es ein normales, obwohl intermediäres, Stoffwechselprodukt der Eiweißkörper ist. Vor wenigen Jahren ist es ja auch K. A. H. Mörner⁵⁾ gelungen, durch hydrolytische Spaltung zunächst von Keratinsubstanzen, später auch von wahren Eiweißkörpern, Cystin direkt und in erheblicher Menge zu erhalten.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XIII, S. 563.

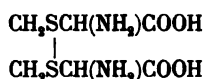
²⁾ Berliner klin. Wochenschr., 1889.

³⁾ Zeitschrift für Biologie, Bd. XXVII, S. 415.

⁴⁾ L. Spiegel, Virchows Archiv, Bd. CLXVI, S. 364.

⁵⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 595 u. Bd. XXXIV, S. 307.

Abgesehen von der großen theoretischen Bedeutung dieser Arbeiten dürften sie auch für die weitere Erforschung und für die klinische Bearbeitung der Cystinuriefrage von größtem Interesse werden. Nicht weniger bedeutungsvoll dürften die Arbeiten über die Konstitution des Cystins von E. Friedmann¹⁾ und C. Neuberg²⁾ werden, sowie die Synthese des Cystins von E. Erlenmeyer jr.³⁾ Nach den genannten Autoren ist die Baumannsche Konstitutionsformel des Cystins nicht zutreffend. Das Cystin ist nicht wie von Baumann angenommen eine α, α , sondern eine α, β substituierte Propionsäure,



eine Tatsache, die die bisherigen mißlungenen, synthetischen Versuche erklären, Versuche, an denen ich mich auch beteiligt habe.

Der Fall von Cystinurie, der mir zur Untersuchung vorlag, betraf eine 26 Jahre alte, zart gebaute Frau. Die Krankheit wurde etwa einen Monat nach einer übrigens normal verlaufenen Geburt entdeckt, indem ein der Patientin abgegangener, erbsengroßer Stein von Professor Dr. Torup als reines Cystin erkannt wurde. Von der klinischen Seite des Falles werde ich als Nichtmediziner im folgenden ganz absehen. Nur erwähne ich, daß an der Patientin nach einigen Jahren eine Nierenexstirpation ausgeführt werden mußte. Sie lebte nachher einige Jahre, bis auch die andere Niere so angegriffen war, daß der Tod etwa 10 Jahre nach der Entdeckung der Krankheit erfolgte.

Der zur Untersuchung erhaltene Stein wog 0,026 g. Unter dem Mikroskop zeigte er sich als bestehend aus den für Cystin charakteristischen sechsseitigen Tafeln. 2 l Harn, die gleich nachher gesammelt wurden, zeigten eine wesentlich von Cystin herrührende kristallinische Trübung. Aus der ganzen Portion Harn wurden durch Essigsäure 0,606 g fast reines Cystin gefällt.

Der Harn wurde jetzt nach der Vorschrift von Baumann

¹⁾ Chem. Zentralbl. 1902, Bd. II, S. 360.

²⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXV, S. 316.

³⁾ Ebenda, Bd. XXXVI, S. 2720.

und v. Udranszky¹⁾ auf Ptomaine verarbeitet. Beim Schütteln mit Benzoylchlorid und Natronlauge entstand ein Niederschlag, der durch fraktionierte Kristallisation aus Alkohol wechselnder Konzentration zwei kristallinische Körper lieferte.

Der eine Körper zeigte den Schmelzpunkt 130°. Eine Stickstoffbestimmung ergab: N-8,97%. Berechnet für $C_{19}H_{22}N_2O_2$: N-9,03%. Der Körper war somit Benzoylpentamethylendiamin (Benzoylcadaverin).

Der andere Körper zeigte den Schmelzpunkt 176°. Eine Stickstoffbestimmung ergab: N-9,39%. Berechnet für $C_{18}H_{20}N_2O_2$: N-9,46%. Der Körper war also Benzoyltetramethylendiamin (Benzoylputrescin).

Es waren also dieselben Ptomaine vorhanden, die von Baumann und v. Udranszky gefunden waren: Cadaverin und Putrescin. Ihre Quantität war aber recht gering. Außerdem erhielt ich auch kleine Mengen anderer kristallinischer Substanzen, die stickstoffhaltig waren, deren Mengen aber für weitere Reinigung und Identifizierung zu klein waren. Die Schmelzpunkte derselben lagen zwischen 180—190° und 192 bis 196°. Ein bei 203—204° schmelzender Körper enthielt 2,88% Stickstoff. Das Filtrat von dem Benzoylniederschlag wurde mit Schwefelsäure angesäuert, wobei eine reichliche Fällung von Benzoesäure entstand. Sodann wurde es mit Äther ausgeschüttelt, der Äther verjagt und der Rückstand mit 12%iger Natronlauge versetzt. Aus dieser Lösung schieden sich nach einigem Stehen seidenglänzende Kristalle von Benzoylcystinnatrium ab, die abfiltriert wurden und sich in Wasser leicht löslich erwiesen. Auf Zusatz von Schwefelsäure zu dieser Lösung wurde das Benzoylcystin als Gallerte gefällt.

Im Laufe von etwa zwei Monaten verschwanden allmählich die Ptomaine, während das Cystin immer noch da war. Nachher war es auch nicht mehr möglich, das Benzoylcystinnatrium zu erhalten.

Beim Behandeln einer Reihe normaler Harne mit Benzoylchlorid und Natronlauge erhielt ich weder Benzoylptomaine noch Benzoylcystinnatrium. Der Rückstand des ätherischen Auszuges gab aber in sämtlichen Fällen beim Erhitzen mit Bleiessig und

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XIII, S. 563.

Natronlauge eine Schwärzung von Schwefelblei, ein Umstand, der darauf deutet, daß jeder normale Harn Spuren von Cystin enthält, oder wenigstens von einem Körper, der sowohl unoxydierten Schwefel wie eine Amidogruppe enthalten muß, weil doch hier die Fähigkeit mit Benzoylchlorid zu reagieren an eine Amidogruppe gebunden ist.

v. Udranszky und Baumann fanden auch dieselben Ptomaine in den Faeces des Cystinpatienten. Ich verarbeitete 5 verschiedene Portionen Faeces genau nach den Angaben genannter Forscher, konnte aber keine Benzoylptomaine isolieren.

Die verschiedenen Autoren, die über Cystinurie gearbeitet haben, haben ein besonderes Gewicht darauf gelegt, ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Cystins zu ersinnen. Dies war aber, wenigstens zu der Zeit, wo ich meine Untersuchungen ausführte, nicht gelungen.¹⁾

Was zunächst die Fällung des Cystins betrifft, so läßt sich voraussagen, daß es sich als Säure am besten durch eine der stärksten Säuren, z. B. Salzsäure ausfällen lassen muß. Es besitzt aber wegen seiner beiden Amidogruppen auch schwach basische Eigenschaften, weshalb es mit starken Säuren Salze zu bilden fähig sein wird. Daraus ergibt sich, daß die Fällung mit einer der schwächeren Säuren, z. B. Essigsäure, bewerkstelligt werden muß. Dies ist ja auch schon längst empirisch herausgefunden. Wie zu erwarten, ist aber die Fällung lange nicht vollständig. So konnte ich, wie oben angeführt, aus einem mit Essigsäure ausgefällten Harn noch Benzoylcystinnatrium gewinnen, und bei der weiter unten mitgeteilten Versuchsreihe erhielt ich nie eine Fällung von Cystin mit Essigsäure, trotzdem letzteres vorhanden war.

Was nunmehr die Benzoylierungsmethode von Baumann und v. Udranszky betrifft, so liefert sie, wie es aus dem oben

¹⁾ Jetzt sind allerdings einige Methoden angegeben. Von diesen scheint die von Abderhalden (Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 558) angewandte Fällung durch β -Naphtalinsulfochlorid nach der allgemeinen Regel für die Fällung von Aminosäuren von E. Fischer und Bergell (Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXV, S. 17) besonders zweckmäßig zu sein.

gesagten hervorgeht, zwar höhere Werte für das Cystin; das Benzoylcystinnatrium ist aber in Wasser viel zu löslich, um als Maß für die Cystinmenge dienen zu können. So erhielt ich bei der weiter unten beschriebenen Versuchsreihe nie Kristalle von Benzoylcystinnatrium, wenn nicht der Harn vor der Benzoylierung stark eingengt wurde.

Unter diesen Umständen fand ich es am meisten angezeigt, denselben Weg wie Bruno Mester¹⁾ einzuschlagen, einen Weg, der, wie ich aus der späteren Literatur sehe, oft benutzt worden ist. Derselbe bestimmte den im Harn des Cystinpatienten von Baumann vorhandenen oxydierten Schwefel, sowie den Gesamtschwefel. Die Differenz dieser beiden Zahlen gab ihm den unoxydierten, «neutralen» Schwefel. Derselbe konnte zwar nicht ohne weiteres auf Cystin umgerechnet werden, weil, wie schon oben bemerkt, auch normaler Harn unoxydierten Schwefel (Cystin) enthält.

| Nr. | Gesamtschwefel
g | Unoxydierter
Schwefel
g | Prozente des
unoxydierten Ge-
samtschwefels | Im
Mittel |
|-----|---------------------|-------------------------------|---|--------------|
| 1 | 0,0950 | 0,0125 | 13,2 | 23,7 % |
| 2 | 0,0700 | 0,0175 | 25,0 | |
| 3 | 0,1099 | 0,0329 | 30,0 | |
| 4 | 0,0825 | 0,0204 | 24,7 | |
| 5 | 0,0764 | 0,0188 | 24,6 | |
| 6 | 0,0677 | 0,0167 | 24,7 | |

Die Menge des unoxydierten Schwefels im normalen Harn wird von den verschiedenen Autoren von 15—20% des Gesamtschwefels angegeben. Mester²⁾ fand bei gemischter Kost bei 9 verschiedenen Individuen Schwankungen von 12,1—30,6%, im Mittel 18,1%. Vorstehend teile ich einige Zahlen mit über die Schwefelausscheidung bei einem gesunden, 23 Jahre alten Manne, die ich bestimmt habe. Die Zahlen unter 2 und 5 beziehen sich auf den Morgenharn, die übrigen auf den Harn

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XIV, S. 109.

²⁾ loc. cit, S. 136.

von 24 Stunden, und zwar auf 100 ccm Harn. Die Bestimmungen wurden genau nach Mesters¹⁾ Angabe ausgeführt.

Wie ersichtlich, kann das Verhältnis zwischen oxydiertem und unoxydiertem Schwefel selbst bei demselben Individuum erheblich schwanken. Eine Berechnung durch Subtraktion des in normalen Harnen im Mittel vorhandenen unoxydierten Schwefels von dem im Cystinharn gefundenen und durch Umrechnung der Differenz auf Cystin erscheint demnach ziemlich willkürlich. Indessen ist dies aber auch nicht nötig, um ein hinreichendes Bild von den Verhältnissen zu bekommen. Wie aus den Zahlen Mesters und aus der nachstehenden Tabelle hervorgeht, handelt es sich nämlich hier um so große Differenzen in der Ausscheidung von unoxydiertem Schwefel bei Gesunden und Cystinkranken, daß ein Zweifel über die Grenzlinie überhaupt nicht auftauchen kann.

Der nachstehenden Tabelle schicke ich folgende Bemerkungen voraus: Die Versuchsreihe ist etwa 4 Monate, nachdem sich keine Ptomaine mehr nachweisen ließen, angefangen. Cystin konnte erst nach Einengen größerer Mengen Harns und darauffolgender Benzoylierung nachgewiesen werden. Der Harn reagierte immer alkalisch und bot sonst das Bild eines Cystitisharnes, indem stets ein Sediment von Leucocyten vorhanden war. Bisweilen roch der Harn stark nach Schwefelwasserstoff. Das spezifische Gewicht schwankte zwischen 1,008 und 1,013. Die hauptsächlichste Nahrung war Milch, Kalbfleisch, Eier und Brot. Am 4. bis 9. Mai war Urämie vorhanden, so daß am 5. und 6. Mai gar kein Harn entleert wurde. Die Analysen 28 und 29 sind während einer Schwefelbadekur in Sandefjord ausgeführt worden.

Die Tabelle zeigt zunächst in eklatanter Weise die abnorm hohen relativen Werte des unoxydierten Schwefels. Die niedrigste Zahl finden wir beim Versuche 17 mit 34,6%, die höchste beim Versuche 13 mit 67% des Gesamtschwefels. Im Mittel sämtlicher Versuche beträgt der nichtoxydierte Schwefel 49,3% des Gesamtschwefels, ein etwa dreimal höherer Wert wie bei normalen Individuen.

¹⁾ loc. cit. S. 119.

| Nr. | Datum | Harn-
menge
ccm | Gesamt-
schwefel
in 24
Stunden
g | Unoxy-
dierter
Schwefel
in 24
Stunden
g | Prozente
des nicht-
oxydier-
ten vom
Gesamt-
schwefel | Anmerkung |
|-----|----------|-----------------------|--|--|--|----------------------------|
| 1 | 4. IV. | 1310 | 0,3079 | 0,1452 | 47,2 | |
| 2 | 5. IV. | 730 | 0,3968 | 0,2399 | 60,4 | |
| 3 | 6. IV. | 1330 | 0,7586 | 0,3789 | 50,0 | |
| 4 | 7. IV. | 575 | 0,5325 | 0,2053 | 38,6 | |
| 5 | 8. IV. | 600 | 0,4350 | 0,1662 | 38,2 | |
| 6 | 9. IV. | 780 | 0,5897 | 0,2363 | 40,1 | |
| 7 | 10. IV. | 1200 | 0,9696 | 0,3564 | 36,7 | 1,2 g Resorcin |
| 8 | 11. IV. | 1530 | 0,8400 | 0,4116 | 49,0 | 1,4 „ „ |
| 9 | 12. IV. | 930 | 0,6138 | 0,2725 | 44,4 | 1,4 „ „ |
| 10 | 13. IV. | 1130 | 0,6407 | 0,3345 | 52,2 | 1,4 „ „ |
| 11 | 20. IV. | 900 | 0,6372 | 0,2907 | 45,6 | |
| 12 | 3. V. | 1960 | 0,8310 | 0,5312 | 64,0 | |
| 13 | 4. V. | 280 | 0,1448 | 0,0969 | 67,0 | Eiweiß vorhanden |
| 14 | 7. V. | 50 | 0,0329 | 0,0211 | 64,1 | „ „ |
| 15 | 8. V. | 60 | 0,0548 | 0,0263 | 48,0 | „ „ |
| 16 | 9. V. | 2320 | 1,0625 | 0,3967 | 37,3 | Spur von Eiweiß. Allantoin |
| 17 | 10. V. | 1470 | 0,7673 | 0,2661 | 34,6 | |
| 18 | 11. V. | 2160 | 1,0195 | 0,4363 | 42,8 | |
| 19 | 12. V. | 800 | 0,2792 | 0,1184 | 42,4 | |
| 20 | 13. V. | 1980 | 0,6970 | 0,3999 | 57,4 | |
| 21 | 14. V. | 1770 | 0,5576 | 0,3116 | 55,9 | |
| 22 | 15. V. | 1420 | 0,5510 | 0,2925 | 53,1 | |
| 23 | 16. V. | 1520 | 0,5838 | 0,3132 | 58,8 | |
| 24 | 17. V. | 1600 | 0,7264 | 0,3984 | 54,8 | |
| 25 | 18. V. | 1130 | 0,5616 | 0,2746 | 48,9 | |
| 26 | 19. V. | 1350 | 0,6305 | 0,2876 | 45,6 | 2 kleine Steine abgegangen |
| 27 | 20. V. | 1040 | 0,5252 | 0,2527 | 48,1 | |
| 28 | 25. VII. | 1320 | 0,5161 | 0,2442 | 47,3 | |
| 29 | 2. VIII. | 1020 | 0,4804 | 0,2754 | 57,5 | |

Mester¹⁾ fand im Durchschnitt seiner Versuche 45,7%. Diese hohen Werte werden, wie Mester eingehend geprüft hat, durch irgend welche Diät nicht beeinflusst. Dieselbe Erfahrung habe ich auch gemacht, weshalb ich die Speiseliste der Patientin als überflüssig weglasse.

Bei den Versuchen 7, 8, 9 und 10 wurde etwas Resorcin verabreicht. Dasselbe wurde gut vertragen und geschah, um zu prüfen, ob die Cystinurie, im Sinne der Baumannschen Theorie als ein Fäulnisprozeß betrachtet, hierbei abnehmen würde. Auch war eine Reaktion zwischen dem Cystin und dem Resorcin unter dem Einfluß des Stoffwechsels, wobei leichtlösliche Produkte entstehen könnten, denkbar. Wie ersichtlich, ist aber keinerlei Wirkung zu spüren, ebensowenig wie Mester bei Eingabe von Salol irgend welche Wirkung entdecken konnte.

Beim Versuche 15, nach der Urämie, wurde im Sedimente Allantoin mikroskopisch nachgewiesen. Das Auftreten dieses Körpers dürfte aber mehr der Urämie wie der Cystinurie zuzuschreiben sein. Es wäre sonst schwer verständlich, weshalb es nur dieses einzige Mal nachgewiesen werden konnte.

Eine Wirkung des Schwefelwassers auf die Schwefelausscheidung ist aus den Versuchen 28 und 29 nicht zu sehen. Mester fand zwar nach Verabreichung von Schwefel in Substanz die relative Menge des unoxydierten Schwefels stark herabgesetzt. Die Dosen waren aber dabei kolossal hoch, 30 g lac sulphuris pro Tag.

Die Badekur hatte aber auf das Allgemeinbefinden der Patientin einen sehr günstigen Einfluß, umsomehr weil gleichzeitig die Diät in jeder Hinsicht verbessert und selbst der Genuß alkoholischer Getränke gestattet wurde.

Der Stickstoffwechsel der Patientin war ziemlich gestört, soweit ich nach einer einzelnen Analyse beurteilen kann. So betrug der als Harnstoff vorhandene Stickstoff nur 77% des Gesamtstickstoffes.

Wie schon eingangs hervorgehoben, muß die Baumannsche Theorie der Bildung des Cystins durch Fäulnisprozesse aufgegeben werden. Diese Ansicht habe ich schon in meiner vor-

¹⁾ loc. cit. S. 134.

läufigen Mitteilung von 1892 ausgesprochen, erstens weil ich im Darminhalt keine Ptomaine nachweisen konnte, zweitens weil die Ptomaine im Harn nach einiger Zeit verschwanden. Außerdem, wenn die Annahme von Baumann und v. Udranszky richtig wäre, dann müßte es durch Desinfektion des Darms, respektive durch Darmspülungen gelingen, das Cystin zum Verschwinden zu bringen. Dies ist aber nicht gelungen, wie sich aus den Versuchen der genannten Forscher¹⁾ und ebenso aus den meinigen ergibt.

Das Cystin ist vielmehr ein normales, aber zum größten Teil intermediäres Produkt des Eiweißabbaus im Organismus.²⁾ Bei normalen Individuen wird es unter Bildung von Schwefelsäureverbindungen und von einfacheren Stickstoffkörpern oxydiert. Nur ein kleiner Teil, entsprechend etwa 20% des Gesamtschwefels, gelangt unverändert in den Harn.

Hiergegen ist aber einzuwenden, daß es bis jetzt nicht gelungen ist, das Cystin aus normalem Harne zu gewinnen. Nach den oben erwähnten Untersuchungen von K. A. H. Mörner wissen wir aber, daß es mehrere Arten von Cystin gibt, was sich übrigens aus seinen beiden asymmetrischen Kohlenstoffatome voraussagen ließ. So erhielt Mörner bei seinen Eiweißspaltungen einige andere Formen des Cystins, die sich durch verschiedenes Drehungsvermögen und das äußere Ansehen der Kristallformen von dem gewöhnlichen, in sechsseitigen Tafeln kristallisierenden Cystin unterscheiden. Er hebt besonders eine nadelförmige, leichtlösliche Modifikation hervor. Es könnte nun im normalen Harne dieses Cystin vorhanden sein. Diese Frage harrt aber noch ihrer endgültigen Beantwortung.

Was nun die Diamine als Begleiter des Cystins betrifft, da ist es ja sehr gut möglich, daß auch diese Körper intermediäre Eiweißspaltungsprodukte sind, die im normalen Organismus weiter oxydiert werden. Die Fähigkeit dieser weiteren Oxydation fehlt eben dem Cystinpatienten.

Das Cystin per os verabreicht, übt auf den Organismus keinen schädlichen Einfluß aus, was aus zahlreichen Fütterungs-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XV, S. 90.

²⁾ cf. L. Spiegel. loc. cit.

versuchen in der letzten Zeit hervorgeht. Es ist eben die Schwerlöslichkeit des Körpers, die das Krankheitsbild der Cystinurie bedingt. Unter diesen Umständen müßte eine rationelle Behandlung der Krankheit darauf hinzielen, der Bildung des Cystins vorzubeugen. Dasselbe könnte durch eine Steigerung des Oxydationsvermögens des Kranken bewirkt werden oder durch Verabreichung von Substanzen, die mit dem Cystin innerhalb des Organismus unter Bildung leicht löslicher Körper reagieren. In dieser Richtung sind Versuche von v. Bergmann¹⁾ angestellt worden. Derselbe konnte bei Hunden durch Fütterung mit Cystin und cholsaurem Natrium die Bildung von den leichtlöslichen Körpern Taurin und Taurocholsäure konstatieren. Leider konnten aber Simon und Campbell²⁾ bei Verabreichung von Cholsäure (Cholsäure?) an einem Cystin-kranken keinerlei Wirkung erzielen. Es ist aber zu erwarten, daß weitere Versuche in dieser Richtung günstige Resultate aufweisen werden.

Bekanntlich hat man schon mehrfach Cystinurie bei mehreren Mitgliedern derselben Familie nachweisen können.³⁾ Eine derartige Familiendisposition war aber hier nach dem Aussagen des Arztes, der die Familie in drei Generationen gekannt und behandelt hatte, nicht vorhanden.

II.

Im Jahre 1893 hatte ich Gelegenheit, noch einen Fall von Cystinurie zu untersuchen. In der Abteilung für Kinderkrankheiten des Reichshospitals zu Christiania war einem elf-jährigen Knaben ein erbsengroßer Stein abgegangen, der als Cystin erkannt wurde. Von dem damaligen Assistenzarzte der Abteilung, Herrn Dr. med. Lyder Nicolaysen, wurde mir eine Tagesmenge Harns von dem betreffenden Patienten zur Untersuchung übergeben.

¹⁾ Chem. Zentralbl. 1903, Bd. II, S. 1079.

cf. auch Wohlgemuth, Diese Zeitschrift, Bd. XL, S. 81.

²⁾ Chem. Zentralbl. 1904, Bd. II, S. 468.

³⁾ Toel, Liebigs Annalen, Bd. LXXVI, S. 247.

Abderhalden, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 557.

Der Harn wurde in gewöhnlicher Weise benzoyliert. Aus dem entstandenen Niederschlage konnte ich keine Benzoylptomaine isolieren. Das Filtrat wurde mit Schwefelsäure gefällt, die ausgeschiedene Benzoessäure abfiltriert und das Filtrat hiervon mit Äther ausgeschüttelt. Nach Verjagen des Äthers wurde der Rückstand mit etwas 12%iger Natronlauge versetzt, und aus dieser Lösung schieden sich nach einigem Stehen seidenglänzende Kristalle aus, die abfiltriert wurden. Beim Waschen mit Wasser auf dem Filter lösten sich diese charakteristischen Kristalle von Benzoylcystinnatrium, während auf dem Filter eine kleine Menge in Wasser unlöslicher Kristallblätter von ganz anderem Aussehen blieben. Dieselben, aus Alkohol umkristallisiert, zeigten den Schmelzpunkt ungefähr 174° . Es lag also hier Benzoylputrescin vor. Dasselbe wurde hier an anderer Stelle isoliert wie in dem oben beschriebenen Falle. Baumann und v. Udranszky, deren Fall offenbar durch weit größere Mengen von Ptomainen ausgezeichnet war, gewannen die Benzoylptomaine sowohl aus dem direkt bei der Benzoylierung entstandenen Niederschlage wie aus dem ätherischen Auszuge neben dem Benzoylcystinnatrium.

Der weitere Verlauf diesen Falles wurde meinerseits nicht verfolgt.

Christiania, Juni 1905.

Zur Kenntnis des Cystins.

Von

Emil Fischer und Umetarō Suzuki.

(Aus dem I. Chemischen Institut der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 29. Juni 1905.)

Wie wir vor einiger Zeit gezeigt haben,¹⁾ läßt sich das Cystin durch Kombination mit den Chloriden der Chloressigsäure, Brompropionsäure und Brom-iso-capronsäure vereinigen, und durch nachträgliche Behandlung der Produkte mit Ammoniak entstehen die Polypeptide, welche als Di-glycyl- Di-alanyl- und Di-leucyl-Cystin bezeichnet wurden.

Um diese Synthese zu erweitern, haben wir jetzt in der üblichen Weise den Dimethylester des Cystins bereitet. Er ist ein stark alkalischer Syrup, bildet aber schön kristallisierende Salze, die so charakteristisch sind, daß sie sich recht gut zur Identifizierung des Cystins eignen. Wir haben sie benutzt, um die durch die Untersuchungen von Neuberg und Mayer²⁾ aktuell gewordene Frage nach der Identität oder Verschiedenheit des Cystins aus Proteinstoffen und aus Cystinsteinen zu prüfen.

Ein solcher Stein wurde uns in freundlichster Weise von Herrn Prof. Oscar Liebreich aus der Sammlung des Pharmakologischen Instituts der hiesigen Universität zur Verfügung gestellt, wofür wir ihm auch hier unseren besten Dank aussprechen. Der Vergleich dieses Materials mit dem reinen optisch aktiven Cystin aus Roßhaar hat uns zur Überzeugung geführt, daß völlige Gleichheit besteht. Auf die gleichlautenden Beobachtungen von Rothera und die etwas abweichenden Angaben von Neuberg und Mayer werden wir unten zurückkommen.

¹⁾ Berichte, Bd. XXXVII, Heft 17, 4575.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 472.

Cystin-di-methylester.

Suspendiert man 10 g gepulvertes reines aktives Cystin in 250 ccm trockenem Methylalkohol, und leitet ohne Abkühlung trockenes Salzsäuregas bis zur Sättigung ein, so findet klare Lösung statt, und nach einiger Zeit, besonders bei Abkühlung, beginnt die Kristallisation des salzsauren Dimethylesters. Um die Abscheidung zu vervollständigen, ist es vorteilhaft, das doppelte Volumen trockenen Äthers zuzusetzen. Das Produkt besteht aus farblosen Prismen, die bei langsamer Kristallisation eine Länge von mehreren Zentimetern haben können. Sie werden abgesaugt, mit trockenem Äther gewaschen und im Vacuumexsikkator getrocknet. Die Ausbeute beträgt 90—95% der Theorie.

Für die Analyse war das Präparat nochmals in wenig warmem Methylalkohol gelöst, mit etwas Tierkohle entfärbt, dann mit Äther abgeschieden, und im Vacuum bei 80° C. getrocknet.

0,1911 g Substanz gaben 0,1949 g CO_2 : 0,0916 g H_2O

0,1913 „ „ „ 13,4 ccm N (21°, 760 mm).

0,2470 „ „ „ 0,2047 g AgCl.

$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{N}_2\text{S}_2\text{O}_4\cdot 2\text{HCl}$: Berechnet C 28,15, H 5,28, N 8,21, Cl 20,82

Gefunden „ 27,82, „ 5,33, „ 7,97, „ 20,50

Das Salz löst sich außerordentlich leicht in Wasser, und die Flüssigkeit hat eine stark saure Reaktion. Es löst sich auch leicht in warmem Methylalkohol, etwas schwieriger in Äthylalkohol, sehr schwer in Essigäther und in Benzol und fast gar nicht in Äther und Petroläther. Das frisch bereitete und vor Feuchtigkeit sorgfältig geschützte Salz schmilzt gegen 170° (korr. 173°) unter starkem Schäumen und nachfolgender Braunfärbung. Der Schmelzpunkt wird aber herabgedrückt, wenn das Präparat kurze Zeit in feuchter Luft steht. Für die Bestimmung des Drehungsvermögens diente eine Lösung in trockenem Methylalkohol.

I. 0,3016 g Substanz in 7,8558 g Methylalkohol bei gewöhnlicher Temperatur gelöst. Drehung im 1 dm-Rohr bei 20° und Natriumlicht 1,14° nach links. Spezifisches Gewicht der Lösung 0,8113.

Die Drehung war nach einer Stunde unverändert.

II. 0,830 g Substanz in 13,71 g Methylalkohol. Drehung bei 20° im 2 dm-Rohr 3,61° nach links. Spezifisches Gewicht 0,8230.

$$\begin{array}{ccc} & \text{I.} & \text{II.} \\ \text{Mithin } [\alpha]_{\text{D}}^{30} = & - 38,0^{\circ} & - 38,4^{\circ}. \end{array}$$

In wässeriger Lösung ist die spezifische Drehung annähernd eben so groß, aber sie ändert sich, höchst wahrscheinlich weil teilweise Verseifung erfolgt. Gefunden wurde nämlich:

| | | |
|-------------------------------|----------------------------|---------|
| 10 Minuten nach der Auflösung | $[\alpha]_{\text{D}}^{30}$ | — 39,2° |
| 25 „ „ „ „ „ | „ | — 40,9° |
| 1 3/4 Stunden „ „ „ | „ | — 43,7° |
| 5 3/4 „ „ „ „ „ | „ | — 44,2° |

Zur Bereitung des freien Cystin-dimethylesters löst man das Salz in wenig Methylalkohol in der Kälte, versetzt mit der für das Chlor berechneten Menge einer 2°/oigen Auflösung von Natriummethylat in Methylalkohol und fügt dann sofort zur Fällung des Natriumchlorid das doppelte Volumen trockenen Äthers hinzu. Die filtrierte Flüssigkeit hinterläßt beim Verdampfen unter stark vermindertem Druck den Cystin-dimethylester als schwach gelben Sirup. Zur Reinigung wird er in Äther gelöst, wobei eine amorphe gefärbte Masse zurückbleibt, und die Lösung im Vacuum verdunstet. Der so erhaltene Ester ist farblos, reagiert alkalisch und löst sich leicht in Wasser und Alkohol, ziemlich leicht in Äther, aber sehr schwer in Petroläther. Er gleicht in diesen Eigenschaften den Estern der gewöhnlichen Aminosäuren. Beim Aufbewahren im geschlossenen Gefäß, auch bei Abschluß der Luft färbt er sich schon nach ein bis zwei Tagen allmählich gelb, später gelbbrot, und entwickelt etwas Ammoniak. Viel rascher erfolgt dieselbe Veränderung in der Wärme. Beim starken Abkühlen, z. B. in flüssiger Luft, erstarrt der Ester, aber ohne deutliche Kristallbildung.

Beim Erhitzen der wässerigen Lösung zersetzt er sich unter Abscheidung eines Öls, das gleichzeitig gelbbraun wird. Ob dabei Cystin gebildet wird, haben wir nicht geprüft. Jedenfalls ist die Verseifung keineswegs so glatt wie bei den gewöhnlichen Aminosäuren. Sehr leicht erfolgt aber die Verseifung des Esters durch Alkalien. Löst man ihn z. B. in kaltem Wasser, fügt in mäßigem Überschuß Natronlauge zu und übersättigt nach

fünf Minuten langem Stehen mit Essigsäure, so fällt eine große Menge Cystin aus.

Außer dem Hydrochlorat haben wir Nitrat, Sulfat und Oxalat kristallinisch erhalten. Das Nitrat fällt aus der ätherischen Lösung des Esters auf Zusatz von starker Salpetersäure erst als Sirup, erstarrt aber bald. In warmem Methylalkohol ist es leicht löslich. Fügt man zu dieser Lösung Äther bis zur Trübung, so scheidet sich das Salz zumal beim Abkühlen in farblosen, mikroskopischen Kristallen ab, die meist spießartig ausgebildet, und öfters sternförmig verwachsen sind. Das Sulfat wird in ähnlicher Weise erhalten. Es ist in heißem Methylalkohol ziemlich schwer löslich und scheidet sich aus der eingeeengten Lösung als weiße Masse ab, in der man unter dem Mikroskop hauptsächlich kuglige Aggregate von äusserst feinen Kriställchen sieht.

Das Oxalat ist im Gegensatz zu den vorhergenannten Salzen in kaltem Wasser ziemlich schwer löslich. Fügt man also zu der konzentrierten wässerigen Lösung der Base eine starke wässerige Lösung von Oxalsäure, so fällt nach einiger Zeit, besonders beim Reiben, das Salz als weiße kristallinische Masse, die aus mikroskopischen Nadeln oder Prismen besteht.

Bringt man den Ester in alkoholischer Lösung mit Pikrinsäure zusammen und fügt Äther hinzu, so fällt nach einiger Zeit das Pikrat in sehr kleinen, gelben, spitzen Kriställchen, die aber meist zu dichten kugligen Aggregaten von undeutlich kristallinischem Gefüge vereinigt sind.

Phosphorwolframsäure erzeugt in der sauren wässerigen Lösung des Esters einen dichten weißen Niederschlag, der in überschüssigen Mineralsäuren nicht löslich ist und beim Kochen der Flüssigkeit schmilzt.

Vergleich des Cystins aus Roßhaar und aus Stein.

Das Haarcystin war in der üblichen Weise durch Hydrolyse mit Salzsäure dargestellt und sorgfältig nicht allein von Tyrosin, sondern auch von racemischem Cystin befreit. Das Cystin aus Stein wurde durch Lösen in Ammoniak und durch Fällern mit Essigsäure oder auch durch Verdunsten der ammoniakalischen Lösung kristallisiert. In allen Fällen erhielten wir nur die

bekannten charakteristischen mikroskopischen sechseitigen Formen, aber keine Nadeln, und das Präparat aus Stein gab auch mit Millons Reagens nicht die rote Färbung des Tyrosins. Dieselbe Übereinstimmung zeigte die optische Untersuchung.

I. 0,3172 g Haarcystin in 11,9228 g Normalsalzsäure gelöst. Spezifisches Gewicht der Lösung 1,029. Drehung bei 20° und Natriumlicht im 2 dm-Rohr 11,84° nach links.

II. 0,3176 g Steincystin in 16,3975 g Normalsalzsäure gelöst. Spezifisches Gewicht der Lösung 1,024. Drehung bei 20° und Natriumlicht im 2 dm-Rohr 8,70° nach links.

| | Haarcystin | Steincystin |
|-------------------|------------|-------------|
| $[\alpha]_D^{20}$ | — 221,9 | — 223,6 |

Diese Zahlen stimmen mit dem Wert¹⁾ von Mörner — 223 bis 224,3° ziemlich gut überein. Die kleine Differenz könnte durch die Temperatur und die verschiedene Konzentration der Salzsäure bedingt sein.

Eine ähnliche Übereinstimmung zeigte sich bei dem salzsauren Dimethylester. Das Präparat aus Cystinstein wurde genau so dargestellt, wie es für Haarcystin vorher beschrieben ist. Der Schmelz- und Zersetzungspunkt war genau derselbe wie bei dem Präparate aus Haarcystin. Ebenso gab die optische Untersuchung eine befriedigende Übereinstimmung.

0,147 g salzsaurer Dimethylester aus Steincystin war gelöst in 3,9953 g Methylalkohol. Die Lösung hatte bei 20° das spezifische Gewicht 0,8116 und drehte in 1 dm-Rohr 1,07° nach links.

$$\text{Mithin } [\alpha]_D^{20} = - 37,2^\circ,$$

während für das Präparat aus Haarcystin — 38,0° gefunden war (s. oben).

Nach diesen Beobachtungen können wir nicht daran zweifeln, daß die von uns untersuchten Präparate aus Roßhaar und aus Stein identisch sind. Zum gleichen Schluß ist kürzlich Rothera gelangt.²⁾ Er fand ebenfalls für Cystin aus Stein und Haar im Aussehen der Kristalle, im physiologischen Verhalten und in der spezifischen Drehung der salzsauren Lösung keinen Unterschied. Leider sind aber seine Angaben über die spezifische Drehung nicht ganz einwandfrei. Wir wollen davon absehen,

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 604 und Bd. XXXIV, S. 207.

²⁾ C. H. Rothera, Journal of Physiology, Bd. XXXII, S. 177.

daß die Berechnung seiner Werte eine doppelt so große spezifische Drehung ergibt, als die von ihm mitgeteilte Zahl, weil hier wahrscheinlich ein Druckfehler vorliegt. Aber die von ihm angegebene spezifische Drehung der salzsauren Lösung

$$[\alpha]_D = - 252,2^\circ \text{ für Steincystin} \\ - 251,1^\circ \text{ „ Haarcystin}$$

weicht erheblich ab von dem Werte, den K. A. H. Mörner festgestellt hat, und den wir bestätigen konnten. Ob das an dem Präparate Rotheras oder der Konzentration der Salzsäure oder an der Ausführung der Beobachtung liegt, entzieht sich unserem Urteile.

Was nun die Beobachtungen von Neuberg und Mayer¹⁾ betrifft, so haben sie zum Schlusse geführt, daß manche Cystinsteine neben Proteincystin in wechselnden Verhältnissen eine isomere Verbindung enthalten, die in Nadeln kristallisiert, eine geringere spezifische Drehung (in salzsaurer Lösung — 206°), andere Löslichkeitsverhältnisse besitzt und auch Derivate von abweichenden Eigenschaften liefert. Obschon es bei den bestimmten und ausführlichen Angaben der Herren Neuberg und Mayer sehr gewagt erscheinen muß, die Existenz dieser Verbindung in Zweifel zu stellen, wenn man nicht Gelegenheit gehabt hat, eine ganze Reihe von Cystinsteinen zu untersuchen, so glauben wir doch eine Beobachtung anführen zu müssen, die für die Beurteilung der Frage nicht ganz gleichgültig sein dürfte. Von Herrn Prof. Gabriel erhielten wir eine kleine Probe des Steincystins, das ihm Herr Neuberg zum Vergleich mit dem synthetisch bereiteten Isocystin übergeben hat, und das zum Teil aus den als charakteristisch angesehenen Nadeln besteht.²⁾ Dieses Präparat zeigt nun, wie wir gefunden haben, mit Millons Reagens eine starke Rotfärbung, wie sie dem Tyrosin eigentümlich ist, dem reinen gewöhnlichen Cystin aber gänzlich fehlt. Wir halten es deshalb für sehr wahrscheinlich, daß es außer Cystin auch Tyrosin enthält, obschon die geringe Menge des uns zur Verfügung stehenden Materials eine Isolierung des letzteren nicht gestattete.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 472.

²⁾ Neuberg und Mayer, Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 478, 479.

Über das Vorkommen von Tyrosin in Cystinsteinen liegt unseres Wissens bisher keine Beobachtung vor, und wir sind auch weit davon entfernt, für alle Cystinsteine einen solchen Gehalt anzunehmen, denn der einzige Stein, den wir untersuchen konnten, gibt Millons Reaktion gar nicht. Er gehört aber auch nach den Kristallisationsproben zu den Steinen, die nach Neuberg und Mayer nur aus «Proteincystin» bestehen. Dagegen vermuten wir, daß Millons Probe positiv ausfallen wird bei den Präparaten, die das in Nadeln kristallisierende sog. Steincystin enthalten, und wir können uns nicht verhehlen, daß ein etwaiger Tyrosingehalt in den Präparaten der Herren Neuberg und Mayer manche Beobachtungen dieser Herren auch ohne die Annahme eines besonderen «Steincystins» erklären würde.

Was endlich das gleichzeitige Auftreten von Cystin und Tyrosin im Harn betrifft, so freuen wir uns, eine Erfahrung der Herren Abderhalden und Schittenhelm mit deren Erlaubnis hier anführen zu können, die als Bestätigung unserer Beobachtung gelten kann. Sie fanden nämlich in dem Harn eines Cystinurikers eine erhebliche Menge von Tyrosin.

Versuche über den Transport von jodiertem Fett bei Phosphorvergiftung.

Von

H. Gideon Wells (University of Chicago).

(Aus dem chemischen Laboratorium des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 2. Juli 1906.)

Bei den Untersuchungen über den Ursprung des Fetts in fettig degenerierten Organen ist die von Lebedeff im Jahre 1883 erfundene Methode in letzter Zeit mehr in Anwendung gekommen. Diese Methode gründet sich auf das Prinzip, daß man in den Fettdepots eines Tieres eine anormale Fettart einführt, durch Phosphor oder analog wirkende Mittel das Tier vergiftet und das anormale Fett in den degenerierten Organen aufsucht. Lebedeff gebrauchte Leinöl (Ol. Lini). Rosenfeld dagegen, der diese Untersuchungsmethode anwandte, hauptsächlich Hammelfett. Der Fetttypus ist durch den Schmelzpunkt und die Jodzahl bestimmt worden. Andere Beobachter haben sich ziemlich genau an den alten Plan gehalten und im allgemeinen gefunden, daß der Schmelzpunkt und die Jodzahl des von degenerierten Organen extrahierten Fettes eher dem fremden, in die Fettdepots des Tieres eingeführten Fett entspricht, als dem normalerweise in den Geweben des Tieres enthaltenen.

Da Leber und Niere, die gewöhnlich studierten Organe, normalerweise eine erhebliche Menge Fett enthalten, welche durch Hungern sich nicht entfernen läßt, enthält das nach der fettigen Degeneration gefundene Fett stets einen größeren oder geringeren Teil dieses normalen Fettes. Hierdurch wird die Zusammensetzung des erhaltenen Fettes beträchtlich modifiziert und verhindert, daß die Resultate so entscheidend sind, wie erwünscht.

Prof. Salkowski wies mich auf die Möglichkeit hin, diesen Gegenstand durch Anwendung von einer Jodfettverbindung aufzuklären, da dieses sich viel leichter erkennen läßt als Hammelfett oder vegetabile Fette. Diese Methode ist in gewisser Beziehung analog den Versuchen von Cavazza, welcher Hunde und Mäuse mit Fett fütterte, das durch Sudan III gefärbt war, und dann nach der Phosphorvergiftung kleine Fetttropfchen in den Leberzellen nachweisen konnte, welche diesen Farbstoff enthielten. Gegen die Methode von Cavazza spricht die Möglichkeit, daß Fett ungefärbt sein kann, wenn es ursprünglich in den Leberzellen gebildet oder abgelagert wird, und dann den Farbstoff, der mit der Nahrung hineingebracht oder von den Fettdepots abgegeben aufgenommen haben kann.

Durch Anwendung eines jodierten Fettes wird die quantitative Bestimmung des fremden Fettes durch eine chemische Methode ermöglicht. Bei diesen Versuchen wurde das Handelsprodukt Jodipin, das therapeutisch als Jodzuführungsmittel benutzt wird und etwa 10% Jod enthält, Kaninchen subkutan eingespritzt. Letztere hatte man so lange hungern lassen, daß möglichst viel von dem Körperfett verschwunden war. Sie wurden dann mit Phosphor vergiftet und zwar mit möglichst großen Dosen, um die Fettdegeneration und den Fetttransport so rasch wie möglich zu bewerkstelligen, weil das Jod natürlich nach kurzer Zeit durch den ganzen Körper verbreitet wird. Die Vermeidung dieses natürlichen Transports soweit wie möglich war deshalb erwünscht, weil man die Befunde in dieser Weise keiner Komplikation aussetzen wollte. Bei jedem Versuch wurde ein Kontrolltier genau in derselben Weise behandelt, jedoch ohne es mit Phosphor zu vergiften. Die Leber und Niere eines jeden Kaninchens wurden gewogen, fein zerhackt und getrocknet, zu einem Pulver gemahlen und das Jod kolorimetrisch bestimmt nach der von Baumann bei seinen Thyreoidanalysen angewandten Methode. Diese wurde gewählt, weil sie die Auffindung und quantitative Bestimmung von äußerst kleinen Jodmengen gestattet. Sogar Mengen und Differenzen von 0,00002 g Jod lassen sich hiermit nachweisen. Die erhaltene Jodmenge wird so bestimmt, daß man vergleicht mit einer Färbung, die

erzeugt wird in 5 oder 10 ccm Chloroform durch Jod, das aus einer bekannten Jodkaliumlösung frei gemacht wird.

Letztere enthält 0,0001 g Jodkali pro Kubikzentimeter. In der aufgestellten Tabelle der Resultate beziehen sich die Zahlen für Jodgehalt auf die Menge der bekannten Jodkaliumlösung, welche nötig ist, einen gleichen Grad der Färbung hervorzurufen.

I. Versuch (18 Stunden).

Zwei Kaninchen, die ursprünglich 3250 und 3570 g wogen, wurden sehr wenig gefüttert, bis sie stark abgemagert waren und nur 2420 g und 2540 g Gewicht hatten. Jedes erhielt dann eine subkutane Injektion von 25 ccm Jodipin und das eine noch 5 Pillen von je 0,0002 g Phosphorgehalt. Das vergiftete Tier starb nach 18 Stunden, das Kontrolltier wurde nach dieser Zeit getötet. Die Autopsie zeigte, daß beide Tiere fast gänzlich frei von Fett waren hinsichtlich des normalen Fettdepots, und daß in der Leber des vergifteten eine geringe fettige Degeneration in der Peripherie der Läppchen, dagegen keine in der Leber des Kontrolltieres eingetreten war.

Das Gewicht der getrockneten Organe zeigte ein relatives Defizit an festen Bestandteilen in der Leber des vergifteten Tieres, ein Zustand, der durchweg bei diesen Versuchen bestätigt wurde.

| | Trockensubstanz: | |
|------------------|------------------|--------|
| | Leber | Niere |
| Vergiftetes Tier | 20,5 % | 21 % |
| Kontrolltier | 28,1 % | 20,1 % |

Die Jodbestimmung zeigte nur eine Spur Jod, weniger als 0,05 mg pro Gramm des getrockneten Organs. In beiden Fällen war die Reaktion etwas stärker in der Niere als in der Leber.

II. Versuch (48 Stunden).

Drei durch Hungern abgemagerte Kaninchen erhielten je eine subkutane Einspritzung von 20 ccm Jodipin, und zwei von ihnen je zwei Pillen mit je 0,002 g Phosphor. Nach 24 Stunden erhielten sie alle je 10 ccm Jodipin und die beiden vergifteten je 5 weitere Pillen. Nach 48 Stunden wurden alle 3 getötet.

Kaninchen A. Gewicht 2050 g, sehr abgemagert. Die Leber zeigte eine schwache fettige Degeneration und wog 115 g. Die Nieren zeigten keine groben Veränderungen und wogen 18 g. Das Trockengewicht der Leber betrug 19,4%, das der Niere 22,9%. Die Bestimmung ergab pro Gramm Lebersubstanz eine Jodmenge, die 0,7 ccm Jodkaliumlösung, pro Gramm Nieren-substanz eine solche, die 1 ccm Lösung entsprach.

Kaninchen B. Gewicht 2250 g, abgemagert, jedoch noch etwas Fett enthaltend. Die Leber war mäßig degeneriert. Das Gewicht derselben betrug 76 g. Die Nieren wiesen keine deutlichen Veränderungen auf und wogen 13 g. Das Trockengewicht der Leber war 26,1%, das der Nieren 25,1%. Das gefundene Jod pro Gramm Substanz für die Leber entsprach 0,8 ccm Jodkaliumlösung, für Niere 1 ccm Lösung.

Kaninchen C (Kontrolle). Gewicht 1900 g. Eine geringe Menge des Körperfetts war noch vorhanden. Die Leber hatte keine Anzeichen einer Degeneration und wog 68 g. Die Nieren waren normal und wogen 13 g. Trockengewicht der Leber 31,9%, der Nieren 23,6%. Das Jod der Leber entsprach 0,7 ccm Jodkaliumlösung, das der Nieren 0,9 ccm.

III. Versuch (72 Stunden).

Während 48 Stunden erhielten 2 abgemagerte Kaninchen von 2500 resp. 2900 g Gewicht 40 ccm Jodipin subkutan eingespritzt, und das eine 17 Pillen von je 0,002 g Phosphorgehalt. Beide wurden nach Ablauf von 72 Stunden getötet.

Vergiftetes Tier. Gewicht 2450 g, sehr abgemagert und fast frei von Körperfett. Die Leber zeigte eine deutliche Degeneration und wog 90,5 g; die Nieren waren ebenfalls sehr fettig und wogen 16,05 g. Trockengewicht der Leber 20,6%, Nieren 20,4%. In beiden Organen eine merkliche Spur Jod, aber weniger als 0,5 ccm Jodkaliumlösung entsprechend, daher zu gering, um es genau bestimmen zu können.

Kontrolltier. Gewicht 2700 g, Körperfett noch vorhanden. Die Leber schien eine sehr geringe Degeneration auf der Peripherie der Läppchen aufzuweisen. Gewicht 99 g. Die Nieren waren normal im Gewicht: 22,65 g. Trockengewicht:

Leber 33,4%, Nieren 24,4%. In der Leber war nur eine Spur Jod, in den Nieren eine Menge, die 1,4 ccm Jodkaliumlösung entsprach.

IV. Versuch (6 Tage).

Zwei Kaninchen, stark abgemagert, von 1650 resp. 1770 g Gewicht erhielten je 53 ccm Jodipin subkutan eingespritzt in geteilten Dosen während 4 Tagen. Eines erhielt außerdem 37 Pillen von je 0,005 g Phosphorgehalt während derselben Zeit. Beide wurden nach 6 Tagen getötet. Das vergiftete Tier war sehr krank.

Vergiftetes Tier. Fast frei von Körperfett. Die Leber zeigte eine deutliche fettige Veränderung und wog 58,5 g. Die Nieren waren ebenfalls sehr fettig und wogen 14,8 g. Trockengewicht: Leber 23,7%, Nieren 18,5%. Das Jod der Leber entsprach 2 ccm Jodkaliumlösung, das der Niere 2,8 ccm. Die fein gepulverte Lebersubstanz wurde mit Äther in einem Soxhlet-apparat extrahiert: das «Fett» betrug 24,2% Gewicht der getrockneten Substanz. Die Untersuchung auf Jod ergab eine Menge pro Gramm, die 4,5 ccm Jodkaliumlösung entsprach.

Kontrolltier, gleich stark abgemagert. Die Leber zeigte keine Degeneration, dagegen eine starke Dunkelfärbung und wog 47,5 g. Die Nieren waren ebenfalls frei von einer fettigen Degeneration und wogen 10,9 g.

Trockengewicht: Leber 28,2%, Niere 24,8%. Jodgehalt der Leber 1,4 ccm, der Niere 2,6 ccm Jodkaliumlösung entsprechend. Der ätherische Auszug betrug nur 7,1% des Gewichtes der Trockensubstanz und enthielt pro Gramm eine Jodmenge, welcher 2,4 ccm Jodkaliumlösung entsprach.

Es ist ersichtlich, daß wir keine Anzeichen eines Transports von Jodipin in irgend welchen erheblichen Mengen von der Injektionsstelle zu den fettigen Organen haben. Die gefundene Jodmenge in den stark fettigen Organen bei den Versuchen III und IV betrug nur eine Spur, höchstens 20 mg in der ganzen Leber bei Versuch IV; ferner ist kein wesentlicher Unterschied zwischen der Jodmenge der Leber der vergifteten Tiere und der der Kontrolltiere, welche keine makro-

skopischen fettigen Änderungen zeigten. Wäre alles Fett in der Leber Jodipin gewesen, so hätte man ungefähr 350 mg Jod gefunden. In Übereinstimmung mit den Versuchen von Winternitz scheint es, als ob ein Teil des Jods von dem Jodipinmolekül abgespalten wird und in anorganischer Form zirkuliert, während nur ein Teil als jodiertes Fett zirkuliert. Denn ein Teil des Jods in der Leber wurde leicht durch Extraktion mit Äther entfernt, während ein Teil ungelöst blieb. Das extrahierte Fett war sicherlich zum größten Teil nicht Jodipin, denn es enthielt nur 0,35 mg Jod pro Gramm, während Jodipin 100 mg pro Gramm enthält.

Folgende Tabelle gibt eine Zusammenstellung der Resultate:

| | Leber
%
Trocken-
gewicht | Nieren
%
Trocken-
gewicht | Leber
Jod-
gehalt ¹⁾ | Nieren
Jod-
gehalt | Äthe-
rischer
Auszug
in % |
|--------------------|-----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| Vergiftetes Tier . | 20,5 | 21,0 | Spur | Spur | — |
| 1 Kontrolltier . . | 28,1 | 20,1 | , | , | — |
| 18 Stunden | | | | | |
| Vergiftetes Tier . | 19,4 | 22,9 | 0,7 | 1,0 | — |
| , , . | 26,1 | 25,1 | 0,8 | 1,0 | — |
| 2 Kontrolltier . . | 31,9 | 23,6 | 0,7 | 0,9 | — |
| 48 Stunden | | | | | |
| Vergiftetes Tier . | 20,6 | 20,4 | Spur | Spur | — |
| 3 Kontrolltier . . | 33,4 | 24,4 | , | , | — |
| 72 Stunden | | | | | |
| Vergiftetes Tier . | 23,7 | 18,5 | 2,0 | 2,8 | 24,2 |
| 4 Kontrolltier . . | 28,2 | 24,8 | 1,4 | 2,6 | 7,1 |
| 6 Tage | | | | | |

Weshalb diese Versuche keinen Transport von jodiertem Fett zeigten, kann man auf verschiedene Weise erklären, ohne

¹⁾ Die Zahlen dieser Reihe beziehen sich auf die Anzahl von Kubikzentimetern einer Lösung, die 0,0001 g Jodkalium pro Kubikzentimeter enthält, welche nötig sind, eine gleich starke Färbung in Chloroform zu erzeugen wie 1 g des getrockneten Organs.

damit den scheinbar positiven Resultaten bei Leinöl und Hammelfett zu widersprechen.

Zunächst könnte man anführen, daß sich jodiertes Fett beim Stoffwechsel vielleicht ganz anders verhält als normales Körperfett, und daß deshalb ein Vergleich beider unberechtigt ist. Zweitens muß die Art der Aufnahme und Ablagerung der Fette im Körper in Betracht gezogen werden. Nach Versuchen von Castle und Loewenhardt¹⁾ wird wahrscheinlich das Fett aus den Depots in Gestalt einer Säure und das Glycerin als solches in die Zellen aufgenommen. Hierbei wird es vielleicht abwechselnd gespalten und aufgebaut nach den Gesetzen des chemischen Gleichgewichts, infolge der reversiblen Reaktion der Lipase.

Winternitz²⁾ fand, daß Blut und Galle und eine alkalische Pankreaslösung, die sämtlich Lipase enthalten, Jod aus Jodipin abspalten. Die Jodabspaltung kann der alkalischen Wirkung dieser Flüssigkeiten auf die frisch getrennten Fettsäuren zugeschrieben werden. Denn man fand, daß saurer Pankreassaft Jodipin in Glycerin und jodierte Fettsäuren spaltet, ohne Jod in Freiheit zu setzen.

Daher ist es wohl möglich, daß das injizierte Fett, selbst wenn es zu den Zellen, die eine Fettdegeneration erleiden, fortgeführt wurde, diese nicht als jodiertes Fett erreicht, sondern, nachdem es das Jod verloren, infolge der Spaltung durch Lipase in den alkalischen Flüssigkeiten. Winternitz stellte fest, daß der größte Teil des Jods im Urin sich wiederfinde, hauptsächlich in Form von anorganischen Salzen, allerdings teilweise in organischen Verbindungen. Man sieht, daß bei fast jedem Versuch die Nieren mehr Jod enthielten als die Leber. In der Niere eines vergifteten Tieres (Versuch III) war viel weniger Jod als in der des Kontrolltieres, obwohl sie eine starke Degeneration zeigte. Dies könnte man auf die durch die Erkrankung herabgesetzte sekretorische Funktion der Niere zurückführen.

Der größere Jodgehalt der Niere ist ferner ein Anzeichen dafür, daß jodiertes Fett nicht als solches transportiert wird,

¹⁾ Chemical News 1901, Bd. LXXXIII, S. 2150—55.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 425.

denn Rosenthal und Rosenfeld haben gezeigt, daß ein verhältnismäßig kleiner oder gar kein Zuwachs an Fett in degenerierten Nieren von Tieren stattfindet, die mit verschiedenen fettige Degeneration erzeugenden Mitteln vergiftet waren. Die Abnahme der Organe an festen Bestandteilen während der Degeneration zeigt sich deutlich bei diesen Versuchen, denn sie ist konstant bei den degenerierten Organen, dagegen fehlt sie bei den nicht degenerierten. Der hohe Wassergehalt ist oft direkt wahrnehmbar, wenn die degenerierten Organe zerkleinert werden.

Katalyse durch Fermente.¹⁾

Von

Hans Euler.

(Der Redaktion zugegangen am 5. Juli 1905.)

Vor einiger Zeit habe ich in dieser Zeitschrift die experimentellen Resultate einer Untersuchung über die chemische Dynamik der zellfreien Gärung²⁾ mitgeteilt, und nach der Theorie für monomolekulare Reaktionen homogener Systeme berechnet.

In letzter Zeit sind indessen gewisse Zweifel über die Anwendbarkeit der aus der Theorie der Lösungen hergeleiteten Gesetze auf enzymatische Reaktionen laut geworden. Es ist hervorgehoben worden, daß die Enzyme Kolloide sind oder mit solchen verbunden scheinen, daß sie sich also nicht im Zustand der echten Lösung befinden. Diese stark betonte Auffassung hat verschiedene Verfasser veranlaßt, die Beziehungen zwischen homogenen katalytischen Reaktionen und Fermentwirkungen zu übersehen und den für letztere gefundenen empirischen Beziehungen andere Ableitungen anzupassen.

Es handelt sich hier (sofern nicht mikroskopisch wahrnehmbare Grenzflächen auftreten) um echte oder Pseudolösungen eiweißartiger Substanzen; dieselben als nicht gelöst anzusehen, liegt meist kein Grund vor. Zwischen Lösungen hochmolekularer Stoffe und ultramikroskopischen Suspensionen ist der Übergang kontinuierlich, und es ist zu erwarten, daß die katalytischen Wirkungen gelöster Fermente von denen ultramikroskopisch suspendierter nicht erheblich verschieden sein werden.

Ich habe nun die bis jetzt studierten Fermentwirkungen in zwei Gruppen zusammengestellt, um so einen Überblick zu

¹⁾ Aus Svenska Vet. Akad. Arkiv f. Kemi, Bd. II.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 53 (1905).

geben, inwieweit sich die Fermentwirkungen den Gesetzen katalytischer Reaktionen im homogenen System anschließen; es wurden dabei alle diejenigen Beziehungen aufgenommen, welche durch Zahlenmaterial genügend gestützt sind.

Versuchsbedingungen und dergleichen wurden nur so weit erwähnt, als sie zur Beurteilung der physikalisch-chemischen Ergebnisse erforderlich schienen; bezüglich der chemischen und biologischen Einzelheiten kann ich auf die bekannten Werke von Duclaux, Hammarsten, Oppenheimer und Green verweisen.

Experimentelle Ergebnisse über die Wirkungsweise der Fermente.

Reaktionen in (kolloidalen oder echten) Lösungen.

Pepsin. (E. Schütz, Diese Zeitschrift, Bd. IX, S. 577, 1885.) Eine globulinfreie Lösung von Eialbumin (etwa 1 g Albumin in 10 ccm Lösung) wird mit etwa 5 ccm 5%iger Salzsäure und der Pepsinlösung versetzt, deren Gehalt bestimmt werden soll; diese Mischung wird auf 100 ccm verdünnt und während 16 Stunden bei 37,5° gehalten. Man entfernt dann das Eiweiß aus der Lösung und bestimmt aus der optischen Drehung letzterer die Menge der gebildeten Peptone. In dieser Weise fand Schütz die Verdauungsgeschwindigkeit proportional der Quadratwurzel aus den Pepsinkonzentrationen.

J. Sjöqvist verfolgte den Verlauf der peptischen Verdauung durch Messung der elektrischen Leitfähigkeit. (Skand. Arch. f. Physiol. Bd. V, 1895.) Von 4 Lösungen, 0,05 norm. in bezug auf Salzsäure, enthielt jede 2,23 Albumin und außerdem 2,5 resp. 5,10 und 15 ccm Pepsinlösung. Es ergab sich, daß die Verminderung der Leitfähigkeit während der ersten zwei Stunden unzweideutig der Quadratwurzel aus der Pepsinkonzentration proportional ist. Bei weiter fortschreitender Reaktion wird nach Sjöqvist die Geschwindigkeit eine andere. Leider fehlen die Angaben der Endwerte der Leitfähigkeit, mit welchen der zeitliche Verlauf der Verdauung hätte berechnet werden können.

Später haben Huppert und Schütz in Pflügers Arch.,

Bd. LXXX, S. 470 (1900) die bereits erwähnten Resultate von E. Schütz und weitere Versuche mit Albumin und Pepsin mitgeteilt. Die entstehenden sekundären Albumosen wurden wieder polarimetrisch bestimmt. «Die Mengen der gebildeten sekundären Albumosen verhalten sich wie die Quadratwurzeln aus den Zeiten». Ferner «stehen die Mengen des verdauten Albumins, die Summe der Zwischenprodukte und die Mengen der sekundären Albumosen in demselben Verhältnis wie die zu den Versuchen verwendeten Albuminmengen, nämlich 1 : 2 : 3 : 4».

Julius Schütz¹⁾ stellte neue Versuche mit gelöstem Hühnereiweiß in der Weise an, daß er das unverdaute Eiweiß seiner nach 15 Stunden entnommenen Versuchsproben koagulierte und im Filtrat den Stickstoff nach Kjeldahl bestimmte. Auch durch diese Versuche wurde die Schützsche Regel bestätigt. Nur bei sehr hohen Pepsinkonzentrationen verliert dieselbe ihre Gültigkeit, wie schon E. Schütz festgestellt hatte.

Spriggs²⁾ hat den Verlauf der Pepsinwirkung durch Messungen der inneren Reibung im Ostwaldschen Viskosimeter verfolgt.

Über die peptische und tryptische Proteolyse von Weizenprotein durch Malzextrakt hat Fr. Weis³⁾ sehr zahlreiche Versuche angestellt. Er fand, daß die peptische Wirkung relativ schnell verläuft, während die tryptische Zerlegung der Albumosen langsam weitergeht; beide Wirkungen können bis zu einem gewissen Grad getrennt werden. Von den Resultaten, deren eingehendere Bearbeitung vielfach auf Schwierigkeiten stößt, ist hervorzuheben, daß auch bei der Proteolyse des Pflanzenproteins in einem gewissen Konzentrationsgebiet wenigstens die Schützsche Regel zu gelten scheint. Der Exponent der Fermentkonzentration wächst nach den Versuchen S. 176 l. c. mit steigender Verdünnung des Ferments von 0,5 bis 1. Ferner habe ich die Versuchsreihen berechnet, in welchen Weis die Konzentration des Substrats (Proteins) variiert hat. Das Resultat kann z. B. aus folgender Tabelle entnommen werden.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 1 (1900).

²⁾ Journ. of Physiol., 28, V. (1902).

³⁾ Meddelelsr. fra Carlsberg-Lab., Bd. V, S. 127 (1903).

| Nach 5 Stunden. ¹⁾ | | | | Nach 2 Stunden. ¹⁾ | | | |
|--------------------------------|---|--------------------------------------|------------------------|--------------------------------|---|--------------------------------------|------------------------|
| Protein-
konzentration
a | Umge-
setzter
N
in Pro-
zenten
des Ge-
samt-N | $k = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$ | $k \cdot a \cdot 10^6$ | Protein-
konzentration
a | Umge-
setzter
N
in Pro-
zenten
des Ge-
samt-N | $k = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$ | $k \cdot a \cdot 10^6$ |
| 1% | 36,2 | 0,00065 | 65 | 1% | 22,0 | 0,00090 | 90 |
| 2% | 25,9 | 0,00043 | 86 | 2% | 17,0 | 0,00067 | 134 |
| 3% | 20,3 | 0,00033 | 100 | 3% | 13,1 | 0,00051 | 153 |
| 4% | 16,0 | 0,00025 | 100 | 4% | 9,1 | 0,00035 | 140 |
| 5% | 13,2 | 0,00020 ₆ | 102 | 5% | 7,9 | 0,00030 | 150 |

Die Reaktionskonstante k sinkt mit steigender Protein-konzentration; das Produkt $k \cdot a$ (a = Anfangskonzentration des Proteins) steigt anfangs mit steigendem a und wird bei größeren Proteinkonzentrationen in einem gewissen Gebiet konstant.

Die Einwirkung von Trypsin auf Gelatine haben V. Henri und Larguier des Bancels (C. r. Bd. CXXXVI, S. 1581, 1902) mit Hilfe von Leitfähigkeitsmessungen studiert. Indem sie, wie früher Sjöqvist die Änderung der Leitfähigkeit dem Fortschreiten der Reaktion proportional setzen, finden sie die Formel $\frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$ bestätigt.

Fibrinferment. E. Fuld, Hofmeisters Beiträge, Bd. II, S. 514, 1902. Das Plasma von Vogelblut wurde mit der Fermentlösung (Extrakt eines Muskels mit 0,8%iger Kochsalzlösung) vermischt. Die Gerinnungsgeschwindigkeit steigt langsamer als der Fermentgehalt; die Schützsche Regel stimmt annähernd; genauer stimmt die Beziehung $\frac{k_1}{k_2} = \left(\frac{c_1}{c_2}\right)^{0,585}$ (k = Gerinnungsgeschwindigkeit, c = Fermentkonzentration). Für lange Gerinnungszeiten, also kleine Enzymkonzentrationen gilt diese Beziehung nicht mehr, die Gerinnungsdauer nimmt dann unverhältnismäßig schnell zu.

¹⁾ Die Zahlen der beiden Tabellen sind in 2 getrennten Versuchsreihen erhalten worden und deshalb unter sich nicht vergleichbar.

Labferment (Chymosin). Eingehende Versuche über die Milchgerinnung durch das von Hammarsten entdeckte Labferment sind neuerdings von E. Fuld, Hofmeisters Beiträge, Bd. II, S. 169, 1902 angestellt worden, und zwar mit Mischungen von frischer Kuhmilch und Wittes Lab. Er fand die schon früher bekannte Proportionalität zwischen Gerinnungsgeschwindigkeit und Enzymkonzentration. Weiters stelle Fuld fest, daß das Lab auf die Milch mit gleichförmiger Geschwindigkeit wirkt, und zog hieraus den richtigen Schluß, daß die Konzentration an unverändertem Casein ohne jeden Einfluß auf den Prozeß ist. Die Proportionalität erfährt auch für beliebig kleine Labdosen und beliebig lange Zeiten keine Einschränkung. Näheres über den Labungsvorgang vergleiche l. c. S. 176.¹⁾

Bezüglich der Bedeutung der Kalksalze für die Wirkung der koagulierenden Fermente sei auf die grundlegenden Arbeiten von Hammarsten (Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 333 und Bd. XXVIII, S. 98) und die neueren Untersuchungen von H. Conradi und von Loevenhart (Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 180, 1904) verwiesen.

Von Pawlow ist die Identität der proteolytischen und koagulierenden Enzyme behauptet worden. Diese interessante Behauptung ist noch näher zu prüfen.

Amylase. Bereits aus älteren Versuchen geht hervor, daß die Spaltung der Stärke angenähert proportional ist der Quadratwurzel aus der Menge der Malzdiastase. Nach neueren Versuchen von V. Henri (Lois générales des diastases, Paris 1903) verläuft die Stärkespaltung nach der logarithmischen Kurve, wenn man die gebildete Maltose als Maß der Reaktionsgeschwindigkeit nimmt. Speicheldiastase wirkt ebenfalls proportional der Wurzel aus der Fermentkonzentration H. T. Brown und T. A. Glendinning (Journ. Chem. Soc., Bd. LXXXI, S. 388, 1902). Wässriges Malzextrakt wird mit 30/oigen Lösungen löslicher Stärke vermischt. In von Zeit zu Zeit herausgenommenen Proben wird das Enzym durch Kochen zerstört und die ge-

¹⁾ Vergl. auch Reichel und Spiro, Hofmeisters Beiträge, Bd. VI, S. 68 (1904). Ein ähnliches Gesetz hat schon früher Dubourg für Urin-ferment gefunden (Duclaux, Traité II, 137).

spaltene Menge Stärke gravimetrisch mit Fehlings Lösung bestimmt. Der Reaktionsverlauf schließt sich ziemlich gut der Formel $\frac{1}{2t} \ln \frac{1+x}{1-x} = k_1$ an.

Invertase. Die ersten Forscher, welche den Reaktionsverlauf dieses Fermentes eingehender studierten, waren O'Sullivan und Tompson (Journ. Chem. Soc., Bd. LVII, S. 834, 1890) und Tammann (Diese Zeitschrift, Bd. XVI, S. 312, 1891). O'Sullivan und Tompson extrahierten Hefe, die zweimonatlicher Selbstverdauung ausgesetzt war, und fällten den Extrakt mit Alkohol. Sie selbst zogen aus ihren Messungen den Schluß, daß die fermentative Inversion gleichwie die Säureinversion der logarithmischen Kurve folgt.¹⁾

Im Gegensatz zu den englischen Forschern fand Tammann, daß die Invertasewirkung nicht durch eine logarithmische Kurve darstellbar ist, sondern komplizierten Gesetzen gehorcht; der Reaktionsverlauf ändert sich wesentlich bei wechselnder Fermentmenge. Vergl. l. c., Tab. V. Bei wachsender Rohrzuckermenge tritt eine starke Verzögerung der Anfangsgeschwindigkeit ein.

Nach Duclaux²⁾ ist die Geschwindigkeit der fermentativen Inversion während der ganzen Reaktion konstant, also die invertierte Zuckermenge einfach proportional der Zeit, $\frac{dx}{dt} = \text{konst.}$

V. Henri (Zeitschrift für physik. Chem., Bd. XXXIX, S. 194, 1901). Das Ferment wurde aus dem wässerigen Hefeextrakt mit Alkohol gefällt, das im Vacuum aufbewahrte Pulver mit Wasser verrieben und die Lösung filtriert. Es ergab sich, daß die Inversion des Rohrzuckers durch Invertin dem Gesetz

$$2 k_1 = \frac{1}{t} \ln \frac{a+x}{a-x}$$

folgt. Die Konstante k_1 ändert sich mit der Anfangskonzentration a und zwar ist sie um so größer, je kleiner a ist. Das Produkt $2 k_1 a$ wirkt mit steigendem a für kleinere Konzen-

¹⁾ Henri zeigte später (l. c.), daß die Werte von k nicht konstant sind, sondern dauernd wachsen.

²⁾ Ann. de l'Institut Pasteur, Bd. XII, S. 96, 1896.

trationen (unterhalb 0,15 normal Rohrzucker), bleibt für mittlere Konzentrationen (0,15—0,5 normal) konstant und sinkt für weiter steigende Konzentration a. Für Rohrzuckerkonzentrationen von 0,4—0,1 normal ist die Inversionsgeschwindigkeit proportional der Fermentkonzentration. Bei höherer Zuckerkonzentration (0,5 normal) steigt die Geschwindigkeit (k) langsamer als die Konzentration der Invertase.

Maltase. Hier liegen zwei, vorläufig nicht vereinbare Angaben vor. E. F. Armstrong hat schnell getrocknete Hefe mit Wasser extrahiert und den filtrierten, klaren Extrakt angewandt (Proc. Roy. Soc. Bd. LXXIII, S. 508). Berechnet dieser Autor seine Messungen nach der Formel $\frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x} = k$, so nehmen die k-Werte mit der Zeit stark ab. Dagegen finden V. Henri und Mlle. Ch. Philoche (Soc. Biol. Bd. LVII, S. 171, 1904), daß nach ihren Versuchen die aus der obigen Formel berechneten k-Werte zuerst sehr stark ansteigen und später etwas fallen. Bessere Konstanz liefert die Berechnung nach der für Invertase aufgestellten Formel $k = \frac{1}{t} \ln \frac{a+x}{a-x}$ bzw. der Formel von Bodenstein

$$k_2 = \frac{a}{t} \left[2 \frac{x}{a} + \ln \frac{a}{a-x} \right]$$

Wie letztere Autoren gefunden haben, verzögert übrigens Lävulose die Maltasewirkung stärker als Glukose.

Laktase. Auch bei diesem Ferment zeigt sich deutlich die Abhängigkeit der Reaktion vom Konzentrationsverhältnis Enzym : Substrat. E. F. Armstrong²⁾ hat über die Einwirkung von Laktase auf Milchzucker 6 Versuche mitgeteilt, welche zur Orientierung dienen können. Von diesen seien hier zwei mitgeteilt: x = hydrolysiertes Milchzucker in Prozenten ausgedrückt,

$$k = \frac{1}{t} \log_{10} \frac{100}{100-x}$$

¹⁾ Einige Versuche über die Einwirkung von Hefemaltase auf Maltose teilt auch R. O. Herzog mit (Zeitschr. f. Allg. Physiologie, Bd. IV, S. 177, 1904).

²⁾ Proc. Roy. Soc., Bd. LXXIII, S. 506 (1904).

2 g Milchzucker in 100 ccm.

| 100 ccm Enzymextrakt | | | 40 ccm Enzymextrakt | | |
|----------------------|------|--------|---------------------|------|--------|
| t Stunden | x | k | t Stunden | x | k |
| 1 | 22,1 | 0,1085 | $\frac{1}{3}$ | 3,2 | 0,0423 |
| 2 | 31,2 | 0,0812 | $\frac{2}{3}$ | 6,4 | 0,0430 |
| 3 | 38,9 | 0,0713 | 1 | 9,6 | 0,0438 |
| 4 | 45,8 | 0,0665 | $1\frac{1}{3}$ | 13,2 | 0,0410 |
| 5 | 51,5 | 0,0629 | 2 | 16,4 | 0,0389 |
| 6 | 56,6 | 0,0604 | 3 | 20,8 | 0,0338 |
| 10 | 69,0 | 0,0509 | 5 | 25,2 | 0,0252 |
| 38 | 98,0 | 0,0447 | 100 | 89,6 | 0,0082 |

Emulsin. Wir verdanken Tammann¹⁾ quantitative Untersuchungen über die Spaltung von Amygdalin, Salicin, Arbutin und Coniferin, welche zum Teil polarimetrisch ausgeführt wurden, zum Teil durch Bestimmung des Traubenzuckers. Es ergab sich wie beim Invertin das Resultat, daß die Spaltungen durch das Emulsin unvollständig verlaufen, «weil das Ferment sich während der Reaktion in eine unwirksame Modifikation umwandelt». Diese Umwandlung, die Lähmung des Ferments, wird durch die Spaltungsprodukte veranlaßt, doch kommt nicht diesen ausschließlich jene Eigenschaft zu. Die unwirksame Fermentmodifikation ist nur unter den Bedingungen des Endzustandes existenzfähig; werden diese verändert, so kann die Reaktion weiter verlaufen.

Auch V. Henri²⁾ fand, daß die Emulsinspaltung nicht der logarithmischen Kurve der Säurespaltung folgt; die Reaktionskonstante nimmt im Verlauf der Reaktion dauernd ab. Wie bei der Invertase verzögert sowohl das Substrat wie die Spaltprodukte die Geschwindigkeit; aber — im Gegensatz zur Invertase — verzögern letztere stärker als das Substrat.

Desgleichen kann die Spaltung von Salicin und Amygdalin nach R. O. Herzog durch eine Gleichung von der Form

$$\frac{dx}{dt} = (k_1 - k_2 x) (a - x)$$

dargestellt werden.³⁾

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XVI, S. 3.

²⁾ Lois générales des diastases.

³⁾ K. Akad. v. Wetenschappen, Amsterdam 1903.

Lipasen und Butyrasen. J.H.Kastle und A.S. Loevenhart (Amer. Chem. J., Bd. XXIV, S. 491, 1902). J. H. Kastle, M. E. Johnstone und E. Elvove (Amer. Chem. J., Bd. XXXI, S. 521, 1904). Das Ferment wurde aus Schweinsleber gewonnen, und es wurde nur filtrierte Extrakt angewandt. Die hydrolytische Spaltung des Äthylbutyrats wurde nach der Formel für Reaktionen 1. Ordnung berechnet. Die Abnahme der Konstanten führen die Verf. auf den schädigenden Einfluß der entstehenden Säuren zurück. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist angenähert proportional der Enzymkonzentration. Nach Kastle und Loevenhart¹⁾ bildet Lipase aus Alkohol und Buttersäure Äthylbutyrat zurück. Bei relativ hohen Esterkonzentrationen ist die in der Zeiteinheit hydrolysierte Estermenge unabhängig von der Konzentration des Esters, es ist also $k \cdot a = \text{konst.}$ Das fettsplattende Ferment des Magens hat bereits früher W. Stade²⁾ sehr eingehend und konsequent untersucht. Die Versuche wurden mit einer Mischung von Eigelblösung und neutralisiertem Magen-saft angestellt. Ich habe den zeitlichen Verlauf der Fettsplattung nach den von Stade gegebenen Versuchsdaten berechnet; folgende zwei Tabellen zeigen das Resultat.

| Stunden | Abgespaltene
Fettsäuren
in Prozenten | $k \cdot 6 \cdot 10^4$ | Stunden | Abgespaltene
Fettsäuren
in Prozenten | $k \cdot 6 \cdot 10^4$ |
|---------|--|------------------------|---------|--|------------------------|
| 2 | 20,4 | 50 | 12 | 24,1 | 100 |
| 4 | 25,6 | 32 | 16 | 25,4 | 80 |
| 6 | 29,8 | 26 | 20 | 27,3 | 69 |
| 8 | 35,3 | 24 | 36 | 39,5 | 61 |
| 10 | 37,6 | 20 | 40 | 40 | 55 |
| 25 | 49,5 | 12 | 46 | 46,2 | 51 |
| 30 | 54,8 | 11 | 65 | 53,6 | 51 |
| 75 | 77,5 | 8 | | | |

Die Konstanten k sind nach der für monomolekulare Reaktionen gültigen Formel berechnet. Die Abnahme derselben ist die gleiche wie die von Kastle für Äthylbutyrat gefundene und ist sehr wahrscheinlich durch die entstehenden Säuren hervorgerufen.

¹⁾ Amer. Chem. J., Bd. XXIV, S. 491 (1901).

²⁾ Hofm. Beitr., Bd. III, S. 291 (1902).

Was den Einfluß der Fettkonzentration betrifft, so ist bei kleinen Fettmengen die Spaltungsgeschwindigkeit unabhängig von der Fettkonzentration, es wird also von einer bestimmten Fermentmenge in der Zeiteinheit prozentisch gleich viel Fett zerlegt. Größere Fettmengen werden langsamer gespalten. Versuche über den Einfluß der Fermentkonzentration bestätigen das schon früher von Volhard¹⁾ mitgeteilte Resultat, daß auch das Magensteapsin der Regel von Schütz folgt und zwar sehr genau. Bezeichnet p die Konzentration der Verdauungsprodukte, f die Steapsinkonzentration, t die Zeit in Stunden, so ist $k = \frac{p}{\sqrt{ft}}$ konstant,

wie z. B. folgende Versuchsreihe zeigt:

| p | f | $= k$ |
|------|-----|--------|
| 24,5 | : 5 | = 4,9 |
| 19,5 | : 4 | = 4,9 |
| 15,0 | : 3 | = 5,0 |
| 8,5 | : 2 | = 4,25 |
| 4,7 | : 1 | = 4,7 |

Zymase. Den Verlauf der zellfreien Gärung habe ich in Buchners Laboratorium untersucht.²⁾ Die bei der Gärung entweichende Kohlensäure wurde teils durch Wägung teils volumetrisch bestimmt.

Der Ausdruck $\frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x} = k$ zeigte sich ziemlich konstant, solange nicht Eiweißniederschläge in der Lösung auftraten; dies war stets in der zweiten Hälfte der Reaktion der Fall, in welcher k stark sank.

1. Mit steigender Zuckerkonzentration nimmt die Gärungsgeschwindigkeit stark ab.

Die Reaktionsgeschwindigkeit ist der Anfangskonzentration nicht umgekehrt proportional und $k \cdot a$ ist somit keine konstante Größe, sondern wird im untersuchten Gebiet um so größer, je kleiner a wird.

2. Die Reaktionsgeschwindigkeit steigt schneller als die

¹⁾ Zeitschr. f. klin. Med., Bd. XLII, S. 414, und Bd. XLIII, S. 397 (1901).

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 53 (1905).

Konzentration des Preßsaftes aber durchgehends langsamer als das Quadrat derselben. Berechnet man den Exponenten n nach der Gleichung $n = (\ln k_1 - \ln k_2) : (\ln c_1 - \ln c_2)$ so findet man, daß n bei gleichem Zuckergehalt mit abnehmendem k_1 , also mit abnehmender Konzentration der Zymase steigt:

| | | | | |
|------------------|------|------|------|------|
| $k_1 \cdot 10^5$ | 10,0 | 8,6 | 3,5 | 1,2 |
| n | 1,29 | 1,33 | 1,52 | 1,67 |

Die Zahlen scheinen darauf hinzudeuten, daß bei sehr hoher Gärkraft Proportionalität zwischen der Konzentration des Preßsaftes und der Gärungsgeschwindigkeit erreicht würde.

Oxydasen. Die Geschwindigkeit, mit welcher Peroxydase und Wasserstoffsuperoxyd auf HJ einwirken, haben A. Bach und R. Chodat (Ber. d. d. chem. Ges., Bd. XXXVII, S. 24 u. 34, 1904) mit dem Massenwirkungsgesetz übereinstimmend gefunden.

Laccase. Nach G. Bertrand wird die Oxydationsgeschwindigkeit unter dem Einfluß der «Laccase» sowohl durch die Konzentration des eiweißartigen Bestandteiles als des hydrolysierten Teiles der anwesenden Mangansalze bedingt. Chemisch-dynamische Messungen über den Mechanismus des Vorgangs fehlen noch.

Das oxydierende Ferment von Lebergewebe ist bezüglich seiner Wirkung auf Salicylaldehyd sehr eingehend von A. Medwedew untersucht worden (Pflügers Archiv, Bd. LXV, S. 249 [1896]; Bd. LXXIV, S. 193 [1899]; Bd. LXXXI, S. 540 [1900] und Bd. CIII, S. 403 [1904]).

Bezüglich des Endzustandes bzw. Gleichgewichtes ergab sich folgendes: Erster Fall; relativ hohe Konzentration des Salicylaldehyds in neutraler-saurer Lösung. Die Konzentration des Oxydationsproduktes (Salicylsäure) ist umgekehrt proportional der Quadratwurzel aus der Konzentration der zu oxydierenden Substanz und annähernd proportional dem Quadrate der Konzentration des Fermentes.

Zweiter Fall; relativ hohe Konzentration des Salicylaldehyds in neutraler-alkalischer Lösung: Eine und dieselbe Menge des Fermentes gibt zum Schluß der Reaktion d. h. bis zum vollständigen Erschöpfen der Oxydationsfähigkeit eine und die-

selbe Menge Säure, unabhängig von der Konzentration des Aldehyds.

Bezüglich der Geschwindigkeit wurde gefunden: a) Wird der Fermentmenge m eine überschüssige Menge Aldehyd a zugesetzt, so ist die Oxydationsgeschwindigkeit proportional der Quadratwurzel aus der Konzentration des Aldehyds. Durch die Oxydation wird das Ferment inaktiviert; die Inaktivierungsgeschwindigkeit läßt sich durch folgende Gleichung ausdrücken

$$\frac{dx}{dt} = k \sqrt{a - ax} \cdot (m - x)$$

wenn m die Konzentration des Fermentes, a diejenige des Aldehyds und x die Konzentration des zur Zeit t inaktivierten Fermentes bedeuten.

b) Die Konzentration des Aldehyds ist geringer als diejenige, welche durch die vorhandene Fermentmenge oxydiert werden kann; in diesem Fall ist die Oxydationsgeschwindigkeit proportional dem Quadrate der Konzentration des Aldehyds

$$\frac{dx}{dt} = k (a - x)^2$$

wenn x die Konzentration des zur Zeit t umgesetzten Aldehyds und a dessen Anfangskonzentration bedeuten.

Katalasen. Diese von O. Loew¹⁾ als besondere Art aufgestellten Enzyme folgen in ihrer Wirkung auf H_2O_2 — wenigstens in einem gewissen Konzentrationsgebiet — den Forderungen der chemischen Dynamik. G. Senter hat ein H_2O_2 zersetzendes Ferment aus defibriniertem Blut gewonnen,²⁾ W. Issajew³⁾ hat ein solches Ferment mit Wasser aus Hefe extrahiert; ich habe Extrakte aus *Boletus scaber*⁴⁾ und aus tierischem Fett⁵⁾ näher untersucht. Die Milchkatalase hat Faitelowitz⁶⁾ studiert. Die fermentative Spaltung des Wasserstoffsuperoxyds erwies sich bei den untersuchten Katalasen als

¹⁾ Rep. U. S. Department of Agriculture, Washington 1901.

²⁾ Zeitschr. f. physik. Chem., Bd. XLIV, S. 257 (1903), und Proc. Roy. Soc., Bd. LXXIV, S. 201—2 (1904).

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 102 (1904).

⁴⁾ Svenska Vet. Akad. Arkiv f. Kemi, Bd. I (1904). Hofm. Beitr. (1905).

⁵⁾ Svenska Vet. Akad. Arkiv f. Kemi, Bd. I, S. 357 (1904).

⁶⁾ Inaug.-Diss. Heidelberg 1904 (Bredig).

eine Reaktion erster Ordnung, welche proportional mit der Konzentration des Enzyms verläuft. Die Abweichungen, welche Issajew bei der Hefekatalase gefunden hat, sind wohl zum Teil durch mangelnde Reinheit der Lösung zu erklären — die Hefe ist bekanntlich schwer zu reinigen. Kleinere Abweichungen treten auch bei den übrigen Katalasen auf, wenn die Wasserstoffsuperoxydlösung konzentriert, nämlich $\frac{1}{100}$ — $\frac{1}{300}$ normal (Senter), bezw. das Enzym relativ verdünnt (Euler) zur Wirkung kommt.

Zum Vergleich mit den Katalasen sei hier noch auf die Wirkungsweise des kolloidalen Platins in Wasserstoffsuperoxydlösungen hingewiesen (Bredig und seine Schüler). Die Zersetzung des Wasserstoffsuperoxyds in neutraler und saurer Lösung geschieht nach der Formel $k = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist wenig abhängig von der Anfangskonzentration des Wasserstoffsuperoxyds. Die Wirkung des kolloidalen Platins steigt schneller als dessen Konzentration, der Wert

$$n = \frac{\ln k_1 - \ln k_2}{\ln c_1 - \ln c_2}$$

wechselte zwischen 1,59 und 1,33.

Reaktionen in heterogenen Systemen.

Pepsin. Die ältesten, von E. Brücke¹⁾ angestellten Versuche lassen erkennen, daß bei relativ hohen Pepsinkonzentrationen Proportionalität zwischen Geschwindigkeit und Fermentkonzentration eintritt.

Mit Hilfe der Mettschen Methode haben Borrisow²⁾ und Samojloff³⁾ die Regel von Schütz geprüft und bestätigt.

J. Sjöqvist⁴⁾ hat die Reptsinwirkung auch im heterogenen System untersucht. Die angewandten Konzentrationen waren 0,05 norm. HCl und 2 g Eiweiß in 100 ccm, während die Pepsinmengen in den Verhältnissen 1 : 8 variiert wurden. Wesentlich ist, daß die Digestionsproben sich (bei 37 °) in

¹⁾ Wiener Sitzungsber., Bd. XXXVII, S. 131 (1859).

²⁾ Dissertation, Petersburg 1891.

³⁾ Arch. Soc. Biol., Bd. II, S. 699, 1893.

⁴⁾ Skand. Arch. f. Physiol., Bd. V, S. 277 (1894).

steter Bewegung befanden. Von Zeit zu Zeit herausgenommene, schnell abgekühlte Proben wurden zentrifugiert, wobei sich das ungelöste Eiweiß als fester Kuchen absetzte. «Es zeigte sich, daß der Reaktionsverlauf der Pepsindigestion sich durch die Gleichung ausdrücken läßt: $dx/dt = \text{konst. } P (10,40 - x)$, worin x die umgesetzte Eiweißmenge, t die Zeit in Stunden, P die relative Pepsinmenge und 10,40 die zu lösende Eiweißmenge (Anfangskonzentration) ist. Es war also unter diesen Umständen die Umsetzung in jedem Moment der noch umzusetzenden Menge proportional.

Trypsin. Nach Pawlow (l. c. S. 33) hat die Schütz-Borissowsche Regel auch für Trypsin volle Gültigkeit.

Später hat H. M. Vernon¹⁾ im wesentlichen nach der Mettschen Methode gearbeitet und glaubt aus seinen Resultaten den Schluß ziehen zu können, daß sich die Digestionsgeschwindigkeiten wie die Quadratwurzeln aus den Trypsinkonzentrationen verhalten.

| Isolierte Glutinaselösung
ccm | Verd. Gelatine | |
|----------------------------------|----------------|-----------------|
| | Gefunden
mm | Berechnet
mm |
| 2 | 6,5 | 6,5 |
| 2 + 2 H ₂ O | 4,5 | 4,5 |
| 2 + 4 „ | 4 | 3,72 |
| 2 + 6 „ | fast 3,5 | 3,25 |
| 2 + 8 „ | 3 | 2,9 |
| 2 + 10 „ | 2,5 | 2,69 |
| 2 + 16 „ | 1,5 | 2,17 |
| 2 + 30 „ | 0,5 | 1,6 |

L. Pollak hat neuerdings²⁾ ebenfalls mit der Methode von Mett die Wirkungsweise seines isolierten, auf Gelatine wirkenden tryptischen Fermentes Glutinasen untersucht und gelangt nach obiger Zusammenstellung zum Resultat, daß die Wirksamkeit des isolierten Leimfermentes zwar nicht genau

¹⁾ Journ. of Physiol., Bd. XXVI, S. 420 (1901).

²⁾ Hofm. Beitr., Bd. VI, S. 95 (1904).

der Regel von Schütz entspricht, sich derselben aber doch weit mehr annähert, als das beim Fermentgemenge eines gewöhnlichen Pankreasinfuses oder des Grüblerschen Trypsins der Fall ist.

Das amylytische Ferment des Pankreassaftes verzuckert Stärke gleichfalls nach der Regel von Schütz-Borissow, wie Versuche von Glinski und Walther¹⁾ gezeigt haben, welche in Pawlows Laboratorium dünne Glasröhrchen mit gefärbtem Stärkekleister füllten und nach einer gewissen Zeit ($\frac{1}{2}$ Stunde) die Länge der aufgelösten Stärkesäule maßen.²⁾

Lipase. Das Cytoplasma von Ricinussamen spaltet Baumöl in Gegenwart von (mit Essigsäure) angesäuertem Wasser. Diese interessante Fermentwirkung hat M. Nicloux³⁾ untersucht.

Bei sehr starker Fermentwirkung sind die Werte $\frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x} = k$ konstant. Kleine Mengen Cytoplasma (suspendiert) im zu spaltenden Öl wirken proportional ihrer Menge.

Zymase. J. H. Aberson⁴⁾ hat die alkoholische Gärung der Glykose sehr eingehend untersucht. Die Hefe wird in einer mit Nährlösung versetzten Glykoselösung suspendiert und in einem Rotationsapparat geschüttelt.

Von Zeit zu Zeit herausgenommene Proben werden von der Hefe abfiltriert, worauf der Zuckergehalt polarimetrisch bestimmt wird. Berechnet man die Versuche so, wie wenn ein homogenes System vorläge, so ergibt sich, daß die nach Formel $\frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$ berechneten Konstanten erheblich steigen (wobei der Zuwachs der Hefe bereits berücksichtigt ist). Eine bessere

¹⁾ Vergl. Pawlow, Arbeit der Verdauungsdrüsen, S. 34.

²⁾ Über die Umwandlung von Stärkekleister in Zucker durch Speichelferment liegt eine ältere Arbeit von Cohnheim vor (Virchows Archiv, Bd. XXVIII, S. 246, 1863).

Auch eine Untersuchung von A. Schwarzer (Journ. f. praktische Chemie, Bd. I, S. 25, 1879) ist hier zu erwähnen.

³⁾ C. r. Soc. Biol., Bd. LVI, S. 840. Siehe ferner V. Henri und M. Nicloux, C. r. Soc. Biol., Bd. LVII, S. 175 (1905).

⁴⁾ Rec. Trav. Chim. d. Pays-Bas, Bd. XXII, S. 78 (1904).

Konstanz hat Aberson für die Werte $k_2 = \frac{1}{t} \ln \frac{a+x}{a-x}$ gefunden.

Die Geschwindigkeit der Gärung ist der Hefemenge nahezu proportional. Die k_2 -Werte nehmen mit steigender Anfangskonzentration a des Zuckers ab, dagegen steigen die Produkte $k_2 \cdot a$ mit steigendem a .

Die sehr zahlreichen Versuche Abersons über den Endzustand der Glukoselösungen, welcher unter den verschiedenen Bedingungen erreicht wird, und über die Umkehrbarkeit der Gärung können hier nicht besprochen werden.

R. O. Herzog¹⁾ hat vorläufige Versuche veröffentlicht, welche er mit Acetondauerhefe (Zymin aus der Fabrik Schroder) angestellt hat. Der Verlauf der Gärung wurde durch Wägung der entwickelten Kohlensäure verfolgt. Auch Herzog hat die Emulsion von Zymin in Glukoselösungen rechnerisch als homogenes System behandelt.

Der Reaktionsverlauf läßt sich teilweise durch die Formel $\frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$, teilweise durch $\frac{1}{t} \ln \frac{a+x}{a-x}$ besser darstellen. Als Exponent n der Gleichung $\frac{k_1}{k_2} = \left(\frac{c_1}{c_2}\right)^n$ gibt Herzog den Wert 2 an.

Um zu erfahren, wie sich dieser Exponent mit der Konzentration der Zuckerlösungen ändert, habe ich noch weitere Versuche mit Acetondauerhefe angestellt, und zwar ist mir von der Firma A. Schroder ein glykogenarmes Präparat geliefert worden, dessen Selbstgärung vollständig vernachlässigt werden konnte. Die entwickelte Kohlensäure wurde volumetrisch bestimmt,²⁾ und zwar entwickelte sich die Kohlensäure ständig unter mechanischem Schütteln und unter dem Unterdruck von $\frac{1}{2}$ Atmosphäre. Fehler durch Übersättigung wurden dadurch vermieden. Diese Versuchsanordnung dürfte der von Herzog angewandten vorzuziehen sein; den Verlauf der Gärung fand ich wenigstens durchaus regelmäßiger als Herzog, wie z. B. folgende Zahlen zeigen:

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 149 (1902).

²⁾ Vergl. Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 56 (1906).

20 ccm 1-norm.-Glukoselösung.

3,6 g Zymin.

Vor dem Versuch entwickelt: 138 ccm CO₂.

| Zeit in Minuten | 0 | 36 | 93 | 118 | 192 | 258 | 393 | 433 |
|---|---|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ccm entwickeltes CO ₂
20°, 760 mm | 0 | 34 | 82 | 102 | 164 | 222 | 320 | 349 |

20 ccm 1-norm.-Glukoselösung.

1,2 g Zymin.

Vor dem Versuch entwickelt: 12 ccm CO₂.

| Zeit in Minuten | 0 | 36 | 92 | 188 | 256 | 391 | 440 |
|---|---|----|----|------|-----|-----|-----|
| ccm entwickeltes CO ₂
20°, 760 mm | 0 | 5 | 13 | 25,5 | 35 | 50 | 59 |

Berechnet man meine Resultate in der Art, wie dies Herzog (l. c.) tut, so erhält man nach dem Ausdruck $\frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$ eine sehr befriedigende Konstanz.

Ich arbeitete mit 0,5-, 1-, 1,5- und 2-norm.-Glukoselösungen und variierte die Zymasemenge wie in obigem Versuch, außerdem im Verhältnis 1:2 (3 bzw. 1,5 g Zymin auf 20 ccm Lösung). Gegen meine Erwartung ergab sich aus meinen Versuchen das Resultat für das von mir untersuchte Konzentrationsgebiet, daß die Reaktionsgeschwindigkeit mit der Zyminmenge um so stärker zunimmt, je verdünnter die Glykoselösung ist; der Exponent n der Gleichung $\frac{k_1}{k_2} = \left(\frac{c_1}{c_2}\right)^n$ wächst also mit zunehmender Verdünnung.

Betrachten wir zunächst die Reaktionen im homogenen System, so fällt die Ungleichheit der Formeln auf, durch welche die Wirkung der Fermente dargestellt wird. Methodische Fehler, welche allerdings in diesem Gebiet vielfach noch erheblich sind, können nur in wenigen Fällen die Resultate wesentlich beeinflußt haben, da der Reaktionsverlauf, besonders die Rolle mitwirkender Säuren, Basen und Salze vielfach qualitativ noch unvollkommen erkannt ist; die mathematische Behandlung ent-

behrt in diesen Fällen der sicheren Grundlage. Ferner bemerkt man die Abweichung dieser Formeln von den für anorganische Katalysatoren gültigen, obwohl ja für die Fermente dieselben Gesetze zu erwarten wären.

Die Abweichungen von den einfachen Reaktionsgesetzen haben eine Reihe von Hypothesen hervorgerufen, deren Einzelheiten sich gedrängt kaum referieren lassen. Dieselben beziehen sich zum großen Teil auf die bemerkenswerte Tatsache, daß die Gesetze der Fermentreaktionen — wirklich oder scheinbar — sich mit der relativen Konzentration von Substrat und Ferment ändern. Diese Tatsache hat viele Autoren zu der Annahme geführt, daß zwischen Ferment und Substrat eine Verbindung eintritt, welche die Geschwindigkeit der Reaktion bedingt.

Über die Rolle dieser intermediären Verbindungen gehen die Annahmen der verschiedenen Autoren, Hanriot, Brown, Glendinning, Bodenstein, Henri, Medwedew, Armstrong, teilweise auseinander. V. Henri hat diese Annahme mathematisch formuliert.¹⁾

Wird einer Lösung, welche die Substratmenge $a - x$ und die Menge x des Umwandlungsproduktes enthält, die Fermentmenge Φ zugesetzt, so wird sich ein Anteil von Φ , etwa z , mit dem Substrat, ein Teil, etwa y , mit dem Umwandlungsprodukt verbinden. Der freie Anteil des Ferments werde mit X bezeichnet. Die Bildung dieser Verbindungen soll nach dem Massenwirkungsgesetz erfolgen; m und n bezeichnen Gleichgewichtskonstanten.

Man erhält dann die folgenden Gleichungen:

$$(a - x) X = \frac{1}{m} z \quad x X = \frac{1}{n} y \quad \Phi = X + y + z$$

Nun können zwei verschiedene Annahmen gemacht werden.

1. Man kann annehmen, daß der freie Anteil des Ferments, X , mit dem Substrat reagiert; in diesem Fall ist die Reaktionsgeschwindigkeit proportional mit X und $a - x$; es

$$\text{ist also } \frac{dx}{dt} = \frac{k \cdot \Phi (a - x)}{1 + m(a - x) + nx}.$$

¹⁾ C. r., Bd. CXXXV, S. 916, 1902.

| Ferment | Reaktionskonst. $k =$ | Einfluß der Fermentkon-
$n = \frac{\log k_1 - \log k_2}{\log c_1 - \log c_2}$ |
|--------------------|---|--|
| Pepsin | | 0,5 (Schütz' Regel)
0,5
0,5
[0,5]
[0,5]
[1]
0,5—1 |
| Trypsin | $\frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$ | [0,5] |
| Fibrinferment | | 0,585 |
| Labferment | | 1 |
| Diastase | $\frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$
$\frac{1}{2t} \log \frac{a+x}{a-x}$ | [0,5] |
| Maltase | $\frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$ sinkt
$\frac{a}{t} \left(2 \frac{x}{a} + \log \frac{a}{a-x} \right)$ | |
| Laktase | $\frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$ sinkt | |
| Invertase | $\frac{1}{t} \log \frac{a+x}{a-x}$
$\frac{10a}{t} \left(\frac{2x}{a} + \log \frac{a}{a-x} \right) + \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$ | 1 (unter 0,4 norm. Zucker) |
| Emulsin | $\frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$ sinkt
$\frac{40a}{t} \left(-\frac{\epsilon x}{a} + 3 \log \frac{a}{a-x} \right) + \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$
$\left(\frac{1}{t} \log \frac{a-\epsilon x}{a-x} \right) : (1 - \epsilon x)$ | Wie bei Invertase |
| Lipasen, Butyrasen | $\frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$ sinkt
$\left[\frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x} \right]$ | 1 |
| Zymase | $\left[\frac{1}{t} \log \frac{a+x}{a-x} \right]$ | [1] |
| Lebende Hefe | $\left[\frac{1}{t} \log \frac{a+x}{a-x} \right] ?$ | [2 (Herzog)]
[2,1—1,6 (Euler)] |
| Acetondauerhefe | | n sinkt mit steigendem t
von 1,67—1,29 |
| Hefepreßsaft | $\frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$ | 2 |
| Oxydase | | |
| Katalasen | $\frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$ | 1 |

2. Man kann annehmen, daß die Verbindung z zwischen Substrat und Ferment ein instabiles Zwischenprodukt ist, welches sich zersetzt unter Rückbildung der entsprechenden Fermentmenge. In diesem Fall ist die Geschwindigkeit proportional mit z , es wird also $\frac{dx}{dt} = \frac{k \cdot \Phi(a-x)}{1 + m(a-x) + nx}$ und es führen somit beide Annahmen zum gleichen Ausdruck.

Durch Integration der Gleichung erhält man:¹⁾

$$k = \frac{a}{t} \left[(m-n) \frac{x}{a} + n \ln \frac{a}{a-x} \right] + \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}.$$

Setzt man $m = 30$ und $n = 10$, so erhält man

$$k = \frac{10a}{t} \left[2 \frac{x}{a} + \ln \frac{a}{a-x} \right] + \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x};$$

die so gerechneten Werte k stimmen befriedigend mit den Beobachtungen überein, und zwar in recht weiten Grenzen der Substratkonzentration.

Aus der obigen Differentialgleichung erhält man für $x = 0$ die Anfangsgeschwindigkeit $\frac{1 + ma}{ka}$. Ist a sehr klein, so verschwindet $m \cdot a$ gegen 1 und die Anfangsgeschwindigkeit ist proportional der Konzentration; je größer a wird, desto mehr nähert sich die Anfangsgeschwindigkeit der Konstanz und wird schließlich $\frac{k}{m}$.

Auch für den Fall, daß von Anfang an Spaltprodukte zugegen sind, hat Henri die Fermente abgeleitet und mit der Erfahrung in Übereinstimmung gefunden.

¹⁾ Durch das zweite Glied unterschied sich diese Formel von derjenigen von Bodenstein. Bei der Berechnung der Henrischen Versuche hat Bodenstein die Annahme gemacht, daß die Wirksamkeit des Ferments sowohl durch die Saccharose als durch den Invertzucker beeinflusst wird, und zwar ist die erstere Beeinflussung größer als die zweite. Unter dieser Annahme gelangt Bodenstein zu der Gleichung

$$k = \frac{a}{t} \left[(m-n) \frac{x}{a} + n \ln \frac{a}{a-x} \right],$$

wenn m und n die Konstanten, welche die Aktivitätsbeeinflussung des Fermentes ausdrücken.

Bei dem Versuch, die Formeln von Bodenstein und Henri auf die proteolytischen Reaktionen (natürlich soweit sie in Lösung verlaufen) auszudehnen, habe ich indessen bedeutend weniger guten Anschluß an das Experiment gefunden; auch fügen sich meine Versuche über zellfreie alkoholische Gärung nicht (ohne spezielle Annahme) der Theorie von Bodenstein und Henri.

Vielleicht sind es derartige Schwierigkeiten gewesen, welche vor einiger Zeit Herrn R. O. Herzog¹⁾ zu einem Versuch veranlaßt haben, Enzymlösungen als heterogene Systeme zu behandeln.

«Stellen wir uns vor», schreibt Herzog, «daß ein Kapillarsystem, bei welchem die Kapillarwände durch die Oberfläche des Enzyms gebildet werden, vorliegt; kapillare Vorgänge ersetzen die mechanische Rührung. Dann wird der inneren Reibung ein bedeutender Einfluß zufallen; der größeren Viskosität entspricht eine relative Abnahme der Zufuhr an umwandelbarem Stoff in der Zeiteinheit.» «Sei k die Geschwindigkeitskonstante, a die Konzentration an umwandelbarem Stoff, η die innere Reibung, dann setzen wir $k = \left(\frac{1}{\eta}\right)^m$ worin m eine Konstante bedeutet.

Rudorfs Ausdruck für die innere Reibung

$$\eta = R + Aa + Ba_2 + Ca_3$$

(R, A, B, C sind Konstanten) wird in obige Formel eingeführt und dabei $R = 0$ gesetzt. Es folgt dann

$$k = \left(\frac{1}{Aa + Ba_2 + Ca_3}\right)^m$$

«Die Berechnung hat ergeben, daß $m = 1/2$ gesetzt werden kann und daß die Anwendung von bereits zwei Konstanten genügende Übereinstimmung liefert.» Diese Übereinstimmung ist im Original nachzusehen.

Gegen diese Ableitung von Herzog hat Henri²⁾ eine Reihe von, wie mir scheint, sehr berechtigten Einwänden er-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 416 (1904).

²⁾ C. r. Soc. Biol., Bd. LVII, S. 173 (1904) und Zeitschrift f. physik. Chemie, Bd. LI, S. 19 (1906).

hoben, deren Widerlegung¹⁾ Herzog nicht gelungen ist. Zunächst ist nicht einzusehen, wie Herzog daran festhalten kann, daß in Rudorfs Ausdruck für η jemals $R = 0$ gesetzt werden kann, und daß für $a = 0$ auch $R = 0$ werden müsse. Sodann streiten vielfach die Erfahrungen gegen den von Herzog geforderten Zusammenhang zwischen innerer Reibung und Geschwindigkeit der Enzymreaktionen. Ich verweise diesbezüglich auf die Antwort von V. Henri.

Herzog ist bei seiner Darstellung von folgender Überlegung Nernsts ausgegangen: «In der Grenzfläche zwischen zwei miteinander reagierenden Phasen besteht stets Gleichgewicht; die eigentlichen chemischen Prozesse finden im Innern einer Phase statt, und wenn sie schnell genug verlaufen, so ist die Reaktionsgeschwindigkeit allein bestimmt durch die Geschwindigkeit, mit der sich die Konzentrationsunterschiede zwischen der Grenzfläche und dem Innern der Phasen durch Diffusion ausgleichen.» Inwiefern der erstere Satz allgemein ist, soll hier nicht diskutiert werden; daß unter den genannten Umständen die Diffusion den zeitlichen Verlauf heterogener Reaktionen bedingt, dürfte niemand bezweifelt haben. Herrn Herzog gegenüber ist zu erinnern, daß die Bedingung: «wenn sie schnell genug verlaufen» sehr wesentlich ist. Die Diffusionsgeschwindigkeit wird den Verlauf der Reaktionen im heterogenen System nur dann bestimmen, wenn die Reaktionsgeschwindigkeit so groß ist, daß die Lösung an reagierendem Stoff verarmt, wenn also der Grenzschicht in der Zeiteinheit durch Diffusion nicht so viel Substanz zugeführt werden kann, als durch die Reaktion verschwindet.

Die zu Beginn dieser Mitteilung gegebene Zusammenstellung über den zeitlichen Verlauf der Enzymreaktionen zeigt, daß — mit sehr wenig Ausnahmen — die Enzymreaktionen so langsam verlaufen, daß die Konzentration der Lösung an der hypothetischen Grenzfläche zwischen Ferment und Lösung sehr wohl aufrecht erhalten werden kann. Herzogs Behandlung der Enzyme als «Kapillarsysteme» entspricht deswegen nicht der Wirklichkeit, weil wir es hier (unter Beibehaltung der Annahme eines heterogenen Systems) mit Kapillarröhren von etwa

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 222, 1904.

der Größenordnung der molekularen Dimensionen zu tun haben.

Der Ausgleich durch Diffusion wird also, im Gegensatz zu obiger Bedingung, im Vergleich zur Reaktionsgeschwindigkeit sehr schnell erfolgen.

Das vorliegende Zahlenmaterial zeigt ferner — und zwar die beststudierten Enzyme gerade am deutlichsten —, daß die Fermentwirkung um so vollkommener den für katalytische Reaktionen geltenden Gesetzen folgt, je größer die Konzentration des Enzyms im Verhältnis zum Substrat ist; ich erinnere an Henris Versuche über Invertase, an die für Zymase erhaltenen Resultate. Gerade das Gegenteil wäre zu erwarten, wenn es sich um einen Diffusionsvorgang im Sinne Herzogs handelte.

Zu den schnell verlaufenden Fermentwirkungen gehört diejenige der Katalasen. Eine 0,005 norm. Wasserstoffsuperoxidlösung wird von einer mäßig starken Katalaselösung in ungefähr 10 Minuten zu 50% zersetzt. Gerade in diesem Fall haben wir alle Forderungen der chemischen Dynamik recht annähernd erfüllt, und es ist die Annahme, daß hier ein heterogenes System vorliegt, einerseits nicht wahrscheinlich und andererseits unnötig, da sich ja die Vorgänge durch die allgemeinen Gesetze der Lösungen darstellen lassen. Es ist deswegen auffallend, daß neuerdings G. Senter¹⁾ gerade die Katalaselösungen als heterogene Systeme auffassen will.

In die Tabelle S. 438 habe ich auch die wirklich im heterogenen System, also in der wahrnehmbaren Grenzfläche zweier Phasen verlaufenden Reaktionen aufgenommen.

Für den Vergleich zwischen dem Verlauf im homogenen und heterogenen System bieten die Arbeiten über das Pepsin das beste Material. Aus diesen scheint hervorzugehen, daß für die Verdauung in beiden Fällen die gleichen Beziehungen gelten. Falls sich dies an weiteren Versuchen bestätigt, wird man den Schluß ziehen dürfen, daß auch unter den Versuchsbedingungen, wie sie etwa Sjöqvist gewählt hat, die Reaktion so langsam verläuft, daß gegenüber dieser der zeitliche Verlauf der Diffusion nicht in Betracht kommt.

¹⁾ Proc. Roy. Soc., Bd. LXXIV, S. 201 (1904) und Zeitschrift f. physik. Chemie, Bd. LI, S. 673 (1905).

Auch die alkoholische Gärung ist seit kurzem sowohl in Lösung wie auch im heterogenen System untersucht. Die Zymaselösung wurde von mir nach der bekannten Methode von E. Buchner dargestellt, Aberson hat lebende Hefe, Herzog Acetondauerhefe in Zuckerlösungen suspendiert, ebenso O. Grigoriew.¹⁾ Während das Zahlenmaterial von Aberson sehr reichhaltig ist, betrachtet Herzog seine Versuche nur als vorläufige und hat infolgedessen seine Versuchsbedingungen nicht sehr vielseitig variiert. Die Resultate der vier Untersuchungen sind im wesentlichen die folgenden:.

| | Lebende Hefe | Acetondauerhefe | Zymaselösung (Preßsaft) |
|--|---------------------------------------|--|---|
| Reaktionskonstante $k =$ | $\frac{1}{t} \ln \frac{a+x}{a-x}$ | $\frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$
oder
$\frac{1}{t} \ln \frac{a+x}{a-x}$ | $\frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$
(Vergl. l. c. S. 62) |
| Einfluß der Hefemenge bzw. Konzentration der Zymase
$n = \frac{\log k_1 - \log k_2}{\log c_1 - \log c_2}$ | 1 | 2 (Herzog)
1,5 (Grigoriew) | 1,67 — 1,29 |
| Einfluß der Zuckerkonzentration a | $k \cdot a$ wächst mit steigendem a | $k \cdot a$ wächst im untersuchten Gebiet mit abnehmendem a | |
| Konstante A der Temperaturformel von Arrhenius | 7803,5 | 9053 | — |

In der lebenden Hefe und der Acetondauerhefe haben wir ein ausgeprägt heterogenes System, indem hier das Substrat durch eine Scheidewand zum Ferment diffundieren muß. In welchem Grad bei den Versuchen mit lebender Hefe Neubildung bzw. Sekretion der Zymase in Betracht kommt, ist schwer zu sagen. Man könnte die Unterschiede der Resultate Abersons von den mit Acetondauerhefe und Hefepreßsaft erhaltenen dadurch erklären, daß in der lebenden Hefe relativ sehr große Mengen Zymase wirksam waren, während die Hefe bei der

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 299 (1904).

Acetonbehandlung immerhin erheblich geschwächt wird und auch durch das Buchnersche Preßverfahren der Hefe nur ein Teil der Zymase entzogen wird.

Herzog selbst scheint zu der Auffassung gekommen zu sein, daß die Acetondauerhefe kein günstiges Material für chemisch-dynamische Versuche ist. Wegen des von Herzog angegebenen hohen Wertes $n = 2$ (der Wert ist offenbar abgerundet) habe ich weitere Versuche und zwar mit glykogenarmer Dauerhefe angestellt, um zu sehen, ob nicht, wie dies bei homogenen Systemen zutrifft, dieser Wert mit steigender Hefemenge bzw. abnehmender Zuckermenge abnimmt. Dies ist nicht der Fall, wie die folgenden Zahlen zeigen, die ich des Vergleichs wegen in der gleichen Art berechnet habe wie Herzog (vergl. S. 444).

| Konzentration der Glykose | $n = \frac{\log k_1 - \log k_2}{\log c_1 - \log c_2}$ |
|---------------------------|---|
| $\frac{1}{2}$ normal | 2,1 |
| 1 | 1,9 |
| 2 | 1,6 |

Eine sichere Deutung dieser Resultate dürfte vorläufig kaum zu geben sein. Daß aber bei Arbeiten mit Acetondauerhefe die Zellwand eine Rolle spielt, geht aus folgenden Versuchen hervor.

In zwei Reibschalen wurden je 10 g Acetondauerhefe (Schroders glykogenarmes Zymin) mit je 2 ccm verdünnter Zuckerlösung angefeuchtet und mit 70 g feinstem Seesand versetzt. Der Inhalt der einen Reibschale wurde mit einem Glasstab zu einem homogenen Brei gemischt, derjenige der anderen wurde 15 Minuten lang kräftig zerrieben. Hierdurch wurden zwar bei weitem nicht alle, aber ein großer Teil der Hefezellen zerrissen, wie mikroskopisch festgestellt wurde.

Aus jeder der beiden Reibschalen wurden 3 Proben, jede zu 10 g, genau abgewogen und mit 20 ccm einer $\frac{1}{2}$ -normalen Glykoselösung versetzt. Die Gärungsgeschwindigkeit wurde im Thermostaten bei 30° gemessen, und zwar wurden die Messungen begonnen, nachdem das Gemisch sich 2 Stunden im Thermo-

staten befunden hatte. Berechnet man die Reaktionsgeschwindigkeit in derselben Art, wie dies Herzog getan hat, so erhält man folgende Konstanten $k = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$

| | Unzerriebene Aceton-
dauerhefe | | | Zerriebene Aceton-
dauerhefe | | |
|--------|-----------------------------------|---------|---------|---------------------------------|---------|---------|
| K = | 0,00120 | 0,00125 | 0,00116 | 0,00133 | 0,00138 | 0,00141 |
| Mittel | | 0,00120 | | | 0,00137 | |

Daß die Aufschlammung von Zellen in Lösungen nicht ohne weiteres als homogenes System behandelt werden darf, ist wohl unbestreitbar. Wenn, wie dies bei der Hefe der Fall ist, die Gesamtreaktion innerhalb der Zellen vor sich geht, kommen die Konzentrationen in diesen nicht in der umgebenden Lösung in Betracht; ob aber diese beiden Konzentrationen gleich oder auch nur proportional sind, dafür haben wir keinen Anhaltspunkt. Gewiß haben die Messungen von Aberson und Herzog Interesse, nur bezüglich der Wirkungsweise der Fermente dürften sie einstweilen noch keine eindeutigen Aufschlüsse liefern.

Die Auffassung der Fermentlösung im allgemeinen als heterogene Systeme hat sich in der Ankündigung einer neuen Theorie auch V. Henri angeschlossen. Das Substrat soll sich zwischen der Lösung und dem Ferment (Kolloidphase) in einem gewissen Verhältnis $\frac{C_2}{C_1}$ verteilen, entsprechend den für die

Absorption bekannten Beziehungen. Inwieweit die Erfahrungen sich nach diesem Prinzip darstellen lassen, ist erst abzuwarten. Über die Absorption von Kristalloiden durch Pseudolösungen bzw. ultramikroskopische Lösungen von Kolloiden ist bis jetzt so außerordentlich wenig bekannt, daß es jedenfalls vieler Versuche bedürfen wird, um eine sichere Grundlage zu schaffen.

Beibehalten wird also von Henri die von ihm und Bodenstein, von A. Brown,¹⁾ Glendinning²⁾ und Armstrong³⁾ angenommene partielle Verbindung zwischen Ferment und Sub-

¹⁾ Journ. Chem. Soc., Bd. LXXXI, S. 373, 1902.

²⁾ Journ. Chem. Soc., Bd. LXXXI, S. 388, 1902.

³⁾ Proc. Roy. Soc., Bd. LXXIII, S. 526, 1904.

strat, nur daß nach Henris neuester Entwicklung die Verteilung des Substrates zwischen Ferment und Wasser nicht nach konstanten Proportionen zu erfolgen braucht, sondern nach einem empirisch festzustellenden Verteilungskoeffizienten.

In der Tat hat die Annahme, daß eine Verbindung zwischen Ferment und Substrat die Fermentreaktion vermittelt, die Tatsachen zwar noch nicht vollständig, aber bis jetzt am besten darstellen lassen (Bodenstein, Henri). Die Wirkungsweise der Fermente und der anorganischen Katalysatoren erscheint somit als gleichartig: beide vermehren die Konzentration der (die Reaktion vermittelnden) aktiven Moleküle.¹⁾

Stockholms Högskola.

¹⁾ H. Euler, Zeitschrift f. physik. Chemie, Bd. XXXVI, S. 641, 1901 und Bd. XLVII, S. 353, 1904.

Über die Taurocholeinsäure der Rindergalle.

Von

Alf. Gullbring.

(Der Redaktion zugegangen am 7. Juli 1905.)

Daß in der Rindergalle außer der gewöhnlichen Cholsäure noch eine zweite Cholalsäure, die von Latschinof¹⁾ entdeckte Choleinsäure, als gepaarte Säure vorkommt, ist außer Zweifel gestellt. Ob daneben auch die von Mylius²⁾ beschriebene Desoxycholsäure, welche angeblich durch Reduktion aus der Cholsäure entstehen soll, in der Galle als besondere Säure vorkommt, oder ob sie mit der Choleinsäure identisch ist, steht noch dahin. Sicher bewiesen ist jedenfalls das Vorkommen von zwei Cholalsäuren, nämlich Cholsäure und Choleinsäure, und der Theorie nach ist also das Vorkommen von vier gepaarten Gallensäuren möglich.

Von diesen vier Säuren sind schon längst die Glykochol- und die Taurocholsäure durch die Arbeiten von Strecker³⁾ bekannt geworden, wenn auch die Darstellung der letztgenannten Säure in freiem Zustande, in reinen Kristallen erst in der letzten Zeit Hammarsten⁴⁾ gelungen ist. Die Glykcholeinsäure ist in dem hiesigen physiologisch-chemischen Laboratorium vor ein paar Jahren von Wahlgren⁵⁾ isoliert worden, und es blieb also nur übrig, auch die etwa vorhandene Taurocholeinsäure zu isolieren.

Die zu dem Zwecke bisher ausgeführten Untersuchungen an der Rindergalle sind erfolglos gewesen. Aus der Hundegalle,

¹⁾ Berichte der Deutsch. chem. Gesellschaft, Bd. XVIII, 2.

²⁾ Berichte der Deutsch. chem. Gesellschaft, Bd. XIX, 1.

³⁾ Annalen der Chemie und Pharmacie, Bd. LXV, LXVII, LXX.

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLII.

⁵⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVI.

welche der gang und gäbe Vorstellung gemäß nur schwefelhaltige Gallensäuren enthält, hat dagegen Hammarsten¹⁾ eine von der gewöhnlichen Taurocholsäure wesentlich verschiedene, gepaarte, schwefelhaltige Gallensäure isoliert, welche nach der Spaltung mit Alkali eine Cholalsäure lieferte, die ein schwerlösliches Baryumsalz gab und wie die Choleinsäure sich verhielt. Allem Anscheine nach war diese gepaarte Säure also eine Taurocholeinsäure.

Bei dieser Sachlage war es von Interesse, die Taurocholeinsäure auch aus der Rindergalle wenn möglich zu isolieren, und auf Anregung und unter Leitung des Herrn Professor Hammarsten habe ich eine solche Arbeit unternommen. Aus leicht ersichtlichen Gründen kam es hierbei in erster Linie darauf an, die schwefelreichsten Fraktionen der Galle als Ausgangsmaterial zu benutzen. Um solche Fraktionen zu erhalten, bin ich im wesentlichen dem von Tengström²⁾ angegebenen Verfahren gefolgt.

Die beim Schlachten der Tiere erhaltene, ganz frische Galle wurde immer unmittelbar verarbeitet. Sie wurde in einigen Fällen erst konzentriert und dann mit Alkohol vom «Schleime» befreit, in anderen Fällen wurde sie direkt mit dem 6fachen Volumen Alkohol gefällt und dann filtriert. In beiden Fällen wurde das alkoholische Filtrat zur Trockne verdunstet und der Rückstand in so viel Wasser gelöst, daß man eine 2- oder 4^o/oige Lösung erhielt. Diese Lösung wurde mit Alaunlösung (10^o/o) gefällt und das Filtrat mit einer 5^o/oigen Lösung von Eisenchlorid versetzt, bis in der sauer gewordenen Flüssigkeit durch mehr Eisenchlorid keine weitere Fällung entstand. Das von dem Eisenniederschlage getrennte Filtrat, welches Eisenchlorid im Überschuß enthielt, wurde nun durch Zusatz von Natriumcarbonat auf fast neutrale, nur äußerst schwach saure Reaktion gebracht, wobei eine zweite Eisenfällung entstand (Eisenfraktion 2).

Die Alaunfraktion und die Eisenfraktion 1 enthalten allerdings ziemlich viel Schwefel, sind aber so reich an Glykochol-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLII.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLI.

säuren, daß sie nicht gut auf Taurocholsäuren verarbeitet werden können. Die Eisenfraktion 2 wurde durch Behandlung mit Natriumcarbonat in die entsprechenden gallensauren Alkalien übergeführt. Die so erhaltenen Alkaliverbindungen wurden in wässriger Lösung von Salzsäure nicht gefällt und enthielten 3,4% Schwefel. Alle Versuche, aus dieser Fraktion durch fraktionierte Fällung mit Eisenchlorid oder in anderer Weise Fraktionen darzustellen, welche den für reines Taurocholat berechneten Schwefelgehalt hatten, waren erfolglos, und zwar aus dem Grunde, daß einerseits von den Fällungsmitteln der Glykocholate immer reichliche Mengen der Taurocholate mit ausgefällt wurden, und andererseits die Taurocholsäuren immer reichliche Mengen der Glykocholsäuren in Lösung halten.

Es blieb also nichts anderes übrig, als das von den Eisenfällungen getrennte Filtrat, welches man, wie schon Tengström fand, frei oder fast ganz frei von Glykocholat erhalten kann, zur Darstellung der Taurocholsäuren zu verwenden.

Infolge der wechselnden Zusammensetzung der Rinder-galle, d. h. infolge der wechselnden Mengenverhältnisse der verschiedenen Gallensäuren, kann indessen dieses Filtrat in einzelnen Fällen etwas verschiedenartig sich verhalten, und dem entsprechend kann auch die weitere Verarbeitung desselben in verschiedenen Fällen etwas ungleich sich gestalten.

Immer wird jedoch das Filtrat bei neutraler oder schwach alkalischer Reaktion erst bei Zimmertemperatur mit Chlornatrium vollständig gesättigt, und hierbei erhält man immer einen aus Taurocholaten bestehenden Niederschlag. Das hiervon getrennte, mit Salz gesättigte Filtrat versetzt man dann mit Salzsäure bis zu 1% HCl, und gerade bei dieser Prozedur kann das Filtrat in verschiedenen Fällen ein ungleiches Verhalten zeigen. Bisweilen wird es fast nicht gefällt oder nur schwach getrübt; in anderen Fällen trübt es sich dagegen stark und setzt eine zähe, harz- oder honigähnliche Masse ab. In dem Filtrate hiervon können dann nach und nach weitere Flöckchen sich auscheiden.

In einem Falle, wo ich sowohl diesen zähen, honigähnlichen Niederschlag wie die genannten Flöckchen in größerer

Menge erhielt, konnten sie näher untersucht werden. Sie wurden also je für sich gesondert aufgesammelt, in die entsprechenden Alkalisalze übergeführt und wie gewöhnlich mit Alkohol gereinigt. Beide verhielten sich qualitativ gleich, und ihre Lösungen hatten einen anderen, nicht süßlichen und viel stärker bitteren Geschmack als die der Taurocholsäure.

Es war also wahrscheinlich, daß hier wenigstens zum Teil Taurocholeinsäure vorlag, und es wurde nun eine Schwefelbestimmung teils in dem aus der zähen Masse (a) und teils in dem aus den Flöckchen (b) dargestellten Natriumsalze ausgeführt. Das Ergebnis war folgendes:

- a) 0,543 g lieferten 0,222 g $\text{BaSO}_4 = 0,030489 \text{ g S} = 5,61\%$ Schwefel
b) 0,345 „ „ 0,140 „ „ = 0,019228 „ „ = 5,57% „

Die beiden Fraktionen hatten also denselben Gehalt an Schwefel, welcher, wenn man ihn in gewöhnliches Taurocholat umrechnet, 94,44, bzw. 93,45 % Taurocholat entspricht. Da also beide Fraktionen identisch waren, wurden sie zusammen gemischt und weiter verarbeitet. Allem Anscheine nach hatte man hier Taurocholeinsäure, mit Taurocholsäure gemengt und vielleicht auch von Fettsäuren aus Seifen verunreinigt, zu erwarten, und aus dem Grunde versuchte ich erst die gewöhnliche Taurocholsäure nach der Methode von Hammarsten abzuscheiden. Zu dem Ende wurden 5 g der Alkaliverbindungen mit salzsäurehaltigem Alkohol behandelt, die Lösung wurde von den Chloriden durch Filtration getrennt und das Filtrat mit Äther versetzt. Die Taurocholsäure schied sich hierbei allmählich in Drusen oder Ballen von feinen Nadeln aus, und wenn nach einigen Tagen keine Vermehrung der Kristalle mehr zu beobachten war, wurde die Lösung in einen neuen Kolben übergeführt und mit neuem Äther versetzt. Dieses Verfahren wurde wiederholt, bis keine weiteren Kristalle sich bildeten. Da die gesamte so gewonnene Kristallmasse offenbar nicht der ganzen in Arbeit genommenen Menge der gallensauren Salze entsprach und also noch eine Menge Gallensäure in dem Alkohol-äther zu erwarten war, wurde der letztere der spontanen Verdunstung überlassen. Die rückständige alkoholische Lösung wurde mit einer Lösung von Natriumcarbonat behandelt, ein-

getrocknet und mit Alkohol vom überschüssigen Carbonat und von dem Natriumchloride befreit. Die Menge des so gewonnenen Salzes war rund 1 g, also etwa 20% von dem in Arbeit genommenen Taurocholatmenge. Dieses Salz hatte einen stark bitteren Geschmack ohne süßen Nebengeschmack.

Die Schwefelbestimmung ergab folgendes:

0,414 g Substanz lieferten 0,154 g BaSO_4 = 0,021150 g S
= 5,12% Schwefel.

Der gefundene Schwefelgehalt, 5,12%, welcher etwa 87% Taurocholat entspricht, war also nun etwas niedriger als früher, was offenbar daher rührte, daß die Fettsäuren der beigemengten Seifen in der Alkoholätherlösung zurückgeblieben waren. Das noch übrige Salz wurde deshalb noch einmal nach dem von Hammarsten zur Darstellung von Taurocholsäure angegebenen Verfahren auf freie Gallensäuren verarbeitet. Es wurden zu dem Zwecke 0,5 g mit säurehaltigem Alkohol zerlegt und mit Äther versetzt. Es schied sich nunmehr keine Taurocholsäure in Kristallen aus, sondern es wurde nur eine amorphe, harzige Masse gewonnen. Wenn in dem Filtrate durch neuen Ätherzusatz keine weitere Trübung auftrat, wurde die harzige Masse wie gewöhnlich in das Natriumsalz übergeführt, mit Alkohol gereinigt und zu einer Schwefelbestimmung verwendet.

0,3582 g lieferten 0,1516 g BaSO_4 = 0,020820 g S
= 5,81% Schwefel.

Der Schwefelgehalt, 5,81%, in gewöhnliches Taurocholat umgerechnet, entspricht also einem Gehalte von 97,15% Taurocholat.

Das Natriumsalz dieser Taurocholsäure wurde durch Sättigung mit NaCl aus der wässerigen Lösung als eine ölige Masse gefällt. Die Lösung wurde von Bleizucker, Kupfersulfat, Silbernitrat, Alaun oder Chlorbaryum nicht gefällt oder getrübt. Bleiessig fällte sie reichlich und ebenso wurde sie von Eisenchlorid gefällt. Die freie Säure war amorph, mit großer Neigung, Wasser aus der Luft aufzunehmen und zu zerfließen. Dieselbe, von Parke¹⁾ beobachtete Neigung seiner aus Hundegalle darge-

¹⁾ Felix Hoppe-Seyler, Medizinisch-chemische Untersuchungen 1866, Heft 1.

stellten Taurocholsäure, an der Luft zu zerfließen, dürfte wohl auch offenbar von der Beimengung dieser zweiten Säure herühren. Die freie Säure war leicht löslich in Alkohol und konnte aus dieser Lösung durch eine hinreichende Menge von Äther, Aceton, Benzol oder Chloroform gefällt werden. Sie fiel immer amorph aus und bisher habe ich sie nicht in Kristallen erhalten können.

Es gelang mir also in demjenigen Niederschlage, welcher in dem salzgesättigten Endfiltrate durch Zusatz von Salzsäure entstand, eine Taurocholsäure (oder richtiger eine schwefelhaltige Gallensäure) nachzuweisen, die sowohl bezüglich des Geschmackes wie der chemischen Reaktionen wesentlich von der gewöhnlichen Taurocholsäure abwich.

Wie oben bemerkt, erhält man indessen in dem mit NaCl gesättigten, von den ausgeschiedenen Gallensalzen getrennten Filtrate nicht immer durch Zusatz von Salzsäure einen Niederschlag. In dem obengenannten Falle, wo ich im ganzen 20 g einer solchen Fällung erhielt, waren 400 g getrocknete schleimfreie Galle in Arbeit genommen worden. In einem anderen Falle, wo ich 150 g getrockneter Galle verarbeitete, war die Menge des Niederschlages nur etwa 1 g, und in einem dritten, bei Verarbeitung von 450 g getrockneter Galle, wo indessen vor dem Aussalzen dreimal mit Eisenchlorid gefällt wurde, gab das salzgesättigte Filtrat überhaupt keinen Niederschlag mit Salzsäure.

Auf der Anwendung des mit Salzsäure in dem salzgesättigten Filtrate erzeugten Niederschlages als Ausgangsmaterial für die Darstellung der zweiten Taurocholsäure kann also keine allgemein brauchbare Methode zur Reindarstellung der letzteren basiert werden. Da aber das Salz dieser Säure, wie das gewöhnliche Taurocholat, durch Sättigung mit NaCl ausgefällt werden kann, hat man in der nach beendeter Eisenfällung ausgesalzene Masse wahrscheinlich mit einem Gemenge der beiden Taurocholate zu tun, und in dem Falle würde also diese Masse als Ausgangsmaterial der Darstellung dienen können.

Aus dem Grunde habe ich die ausgesalzene Masse von Gallensalzen, deren Menge bei Verarbeitung von 450 g schleim-

freier Galle 60 g betrug, auf das Vorkommen der zweiten Taurocholsäure geprüft. Die Schwefelbestimmung in den ausgesalzenen, mit Alkohol sorgfältig gereinigten, getrockneten Gallensalzen ergab folgendes:

$$\begin{aligned} 0,340 \text{ g lieferten } 0,151 \text{ g BaSO}_4 &= 0,020738 \text{ g S} \\ &= 6,09\% \text{ Schwefel.} \end{aligned}$$

Das Taurocholat (bezw. Taurocholatgemenge) war also als rein zu betrachten. Dieses Taurocholatgemenge wurde nun nach der Methode von Hammarsten auf gewöhnliche Taurocholsäure verarbeitet, und wenn keine solche Säure mehr auskristallisierte, wurde die Alkoholätherlösung mit alkalicarbonathaltigem Wasser ausgeschüttelt. Die wässrige Lösung wurde eingetrocknet, der Rückstand mit Alkohol von dem Carbonate und dem NaCl gereinigt, und der Rückstand der verdunsteten alkoholischen Lösung in so viel Wasser gelöst, daß eine 2%ige Lösung erhalten wurde. Zur Trennung etwa vorhandener Taurocholeinsäure von zurückgebliebener Taurocholsäure wurde diese Lösung mit Eisenchlorid gefällt. Der Eisenniederschlag, welcher als eine zähe, ölige, braungefärbte Masse sich zum Boden setzte, wurde mit Natriumcarbonat zersetzt und also das entsprechende Alkalisalz gewonnen:

Die Schwefelbestimmung gab folgendes Resultat:

$$\begin{aligned} 0,353 \text{ g lieferten } 0,1608 \text{ g BaSO}_4 &= 0,022081 \text{ g S} \\ &= 6,254\% \text{ Schwefel.} \end{aligned}$$

Das Natriumsalz der Taurocholeinsäure enthält, wenn man von der Formel der Choleinsäure nach Lassar Cohn ausgeht, 6,147% Schwefel, und die Schwefelbestimmung, welche 6,254% Schwefel in dem Salze ergab, spricht also in hohem Grade dafür, daß das Salz der fraglichen Säure hier vorlag. Dieses Salz hatte denselben bitteren Geschmack und im übrigen dieselben Eigenschaften, wie das aus der obengenannten, mit Salzsäure erzeugten Fraktion gewonnene Salz. Auch die freie Säure verhielt sich wie die obengenannte, sie kristallisierte ebenso wenig wie diese.

Die Menge des aus den obengenannten 60 g Gallensalzen gewonnenen Taurocholeinates war etwa 3 g.

Zur Entscheidung der Frage, ob, wie oben angenommen

worden, hier in der Tat eine Taurocholeinsäure vorlag, wurde das Salz 12 Stunden mit einer 10%igen Natronlauge im Autoklaven bei etwa 100° C. erhitzt. Die Cholalsäure wurde aus der kalten Flüssigkeit mit Salzsäure ausgefällt und dann wieder in das Natriumsalz übergeführt. Die neutrale 2%ige Lösung dieses Salzes in Wasser gab mit Chlorbaryum eine reichliche Fällung, die erst als eine zähe, harzähnliche Masse am Boden des Gefäßes sich ansammelte, nach einigen Tagen aber mehr feinkörnig, mit Neigung zu Kristallisation wurde. Das Filtrat hiervon enthielt noch ein wenig Cholalat, aus dem die Cholalsäure mit Salzsäure frei gemacht wurde. Diese Cholalsäure gab keine Spure der Myliusschen Jodreaktion und konnte folglich nicht die gewöhnliche Cholsäure sein. In ganz derselben Weise verhielt sich die aus dem Baryumsalze freigemachte Cholalsäure, und bei der Spaltung war also überhaupt keine gewöhnliche Cholsäure entstanden.

Sämtliche durch Spaltung mit Alkali gewonnene Cholalsäure wurde nach sorgfältigem Auswaschen getrocknet und in heißem absoluten Alkohol gelöst. Nach dem Erkalten schied sie sich ziemlich rasch in Kristallen von dem Aussehen der wasserfreien Choleinsäure aus. Der Schmelzpunkt dieser Kristalle war 186—187° C., was gut mit dem von Latschinoff¹⁾ für die wasserfreie Säure angegebenen Werte, 185—190° C., stimmt.

Für die aus Glykocholeinsäure dargestellte, aus Alkohol kristallisierte Choleinsäure fand Wahlgren²⁾ den Schmelzpunkt 185—187°, was ebenfalls mit dem von mir gefundenen Werte gut stimmt. Aus Alkoholäther kristallisiert, zeigte die von mir erhaltene, erst im Exsikkator und dann bei 125° C. getrocknete Säure den Schmelzpunkt 170—171° C. Aus Eisessig mehrmals umkristallisiert, schmolz die Säure konstant bei 145° C.

Es ist bemerkenswert, daß Pregl,³⁾ welcher die Desoxycholsäure nicht aus Alkohol allein, sondern erst nach Zusatz von Äther zu der alkoholischen Lösung kristallisiert erhalten

¹⁾ Berichte d. Deutsch. chem. Gesellschaft, Bd. XVIII, 2.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVI.

³⁾ Wiener Sitzungsberichte, Bd. CXI.

konnte, für die so gewonnenen, in der Luft getrockneten Kristalle den Schmelzpunkt $153\text{--}155^{\circ}\text{C.}$, für die im Vacuum bei höherer Temperatur getrockneten, von Kristalläther befreiten Kristalle den Schmelzpunkt $172\text{--}173^{\circ}\text{C.}$ fand. Die aus Eisessig kristallisierte Desoxycholsäure schmolz dagegen bei $144\text{--}145^{\circ}\text{C.}$ Vahlen¹⁾ fand ebenfalls für die aus Eisessig kristallisierte Desoxycholsäure den Schmelzpunkt $140\text{--}145^{\circ}\text{C.}$

Der Umstand, daß die von mir dargestellte Choleinsäure, aus Alkohol kristallisiert, den Schmelzpunkt der Latschinoff'schen Choleinsäure hatte, während sie dagegen aus Eisessig umkristallisiert den Schmelzpunkt der Desoxycholsäure zeigte, spricht, wie mir scheint, dafür, daß die zwei Säuren, Choleinsäure und Desoxycholsäure, identisch sind. Ohne indessen auf diese strittige Frage des näheren einzugehen, finde ich es am richtigsten, da die Existenz der Choleinsäure unbestritten ist, die von mir aus der neuen Taurocholsäure abgespaltene Cholalsäure als Choleinsäure zu bezeichnen.

Die zweite Komponente der schwefelhaltigen gepaarten Säure, das Taurin, konnte ich leicht isolieren und in reinen, typischen Kristallen erhalten. Ich verfuhr hierbei nach einer von Hammarsten ausgearbeiteten, noch nicht veröffentlichten Methode, welche darauf basiert, daß die Alkaliverbindung des Taurins im Alkohol verhältnismäßig leicht löslich ist, und daß das Taurin aus dieser Lösung durch Zusatz von einer Säure leicht ausgeschieden wird.

Um zu erfahren, ob die aus Rindergalle isolierte Taurocholeinsäure mit der von Hammarsten in der Hundegalle nachgewiesenen zweiten Taurocholsäure identisch ist, habe ich eine Quantität von etwas mehr als 100 ccm Hundegalle genau in der von ihm angegebenen Weise verarbeitet.

Das aus der Eisenfällung durch Behandlung mit Natriumcarbonat gewonnene, mit Alkohol gereinigte und getrocknete Salz hatte einen Gehalt von 5,461% Schwefel, was einer Menge von 88,84% Taurocholeinat entspricht.

$$\begin{aligned} 0,267 \text{ g lieferten } 0,1082 \text{ g BaSO}_4 &= 0,014860 \text{ g S} \\ &= 5,461\% \text{ Schwefel.} \end{aligned}$$

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXIII.

Daß der Gehalt an Schwefel nicht höher war, rührte wahrscheinlich von einer Beimengung von Phosphatiden her, denn die Gegenwart von Phosphor in dem Gallensalze war leicht nachzuweisen, wenn auch die quantitative Phosphorbestimmung infolge der unzureichenden Menge des Materiales nicht ausgeführt wurde. Die aus diesem Gallensalz durch Sieden mit Alkali abgespaltene Cholalsäure verhielt sich in allen Beziehungen wie die aus Rindergalle gewonnene Säure, nur mit dem Unterschiede, daß die aus Alkohol umkristallisierte Säure bei 180—183° C. schmolz. Hammarsten fand den Schmelzpunkt 182° C. Die unter ähnlichen Umständen aus dem Taurocholeinate der Rindergalle gewonnene Cholalsäure hatte, wie oben erwähnt, den Schmelzpunkt 186—187°, und die Frage von der Identität der zwei Säuren kann ich also nicht sicher entscheiden.

Aus dem oben Mitgeteilten geht aber jedenfalls hervor, daß man aus der Rindergalle eine zweite Taurocholsäure isolieren kann, die, nach ihren Zersetzungsprodukten zu urteilen, eine Taurocholeinsäure ist. Bisher konnte die Säure in freiem Zustande nicht in Kristallen, sondern nur als eine amorphe, in Wasser äußerst leicht und auch in Alkohol lösliche, aus dieser Lösung durch Äther, Aceton, Chloroform und Benzol fällbare Masse gewonnen werden. Der Geschmack dieser Säure ist stark bitter, ohne süßen Nebengeschmack. Das Alkalisalz der Säure wird aus wässriger Lösung von Eisenchlorid gefällt und scheidet sich durch Sättigung mit NaCl als eine zähe, ölige oder honigähnliche Masse aus. Die Ausbeute dieser Säure aus Rindergalle ist sehr klein, was wohl zum Teil durch die Schwierigkeit ihrer Reindarstellung bedingt ist.

Da die Säure in Alkoholäther leichter löslich ist als die Taurocholsäure, erhält man aus einem Gemenge der beiden Säuren die Hauptmenge der Taurocholeinsäure in dem Alkoholäther, nachdem die Taurocholsäure durch fraktionierten Ätherzusatz zu der alkoholischen Lösung größtenteils zur Kristallisation gebracht worden ist. Zur Entfernung etwa noch vorhandener Taurocholsäure führt man die in Alkoholäther gelösten Säuren in Alkalisalze über und versetzt die Lösung der letzteren

in Wasser mit Eisenchlorid, welches das Taurocholeinat fällt, wobei indessen Verluste an Taurocholeinsäure nicht zu vermeiden sind.

Als Ausgangsmaterial kann man, wie aus dem obigen hervorgeht, bei Verarbeitung von Rindergalle das aus dem Filtrate nach beendeter Eisenfällung mit NaCl ausgesalzene Gemenge von Taurocholaten und ferner den mit Salzsäure in dem salzgesättigten Filtrate erzeugten Niederschlag, wenn ein solcher in nicht zu kleiner Menge entsteht, verwenden. Für die Darstellung der Taurocholeinsäure aus Hundegalle verfährt man in anderer, nämlich in der von Hammarsten angegebenen Weise.

Zum Schluß bleibt mir noch die angenehme Pflicht, Herrn Professor Hammarsten für die Anregung zu dieser Arbeit und für die Unterstützung während ihres Verlaufes meinen aufrichtigen Dank auszusprechen.

Quantitative Indicanbestimmung im Harn mit dem Melslingschen Kolorimeter.

Von

H. P. T. Oerum.

(Aus dem Laboratorium des Kgl. Friedrichs-Krankenhauses in Kopenhagen.)

(Der Redaktion zugegangen am 14. Juli 1906.)

Quantitative Bestimmungen des Harnindicans stoßen insofern auf Schwierigkeiten, als wir zur Zeit keine Methode zu seiner exakten Bestimmung besitzen; man kann es titrimetrisch nach Wang-Obermayer¹⁾ oder nach Bouma²⁾ durch Überführung in Indigorot messen. So lange es noch unentschieden war, ob man nur das Indigoblau oder die gesamte Indigomenge bestimmen sollte, war die Entscheidung über die Verwendbarkeit der Methode zunächst eine Prinzipienfrage. Nachdem aber Maillard³⁾ sich der Boumaschen Auffassung angeschlossen hat, daß die roten, durch Oxydation des Indoxyls auftretenden Farbstoffs so gut wie das Indigoblau zur Indigogruppe gezählt werden müssen, und Ellinger⁴⁾ ebenfalls dieser Ansicht beigetreten ist, muß man notwendigerweise die Indigorotmethode wählen.

Nun können aber Indicanbestimmungen, die klinisch von großer Bedeutung sind, in der Praxis nicht mit so umständlichen Titrierungsmethoden vorgenommen werden; man hat deshalb nach einfacheren kolorimetrischen Verfahren gesucht.

Salkowski⁵⁾ hat zuerst den Indigo kolorimetrisch bestimmt, indem er ihn mit Chloroform ausschüttelte und die

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 406; Bd. XXVI, S. 427; Bd. XXVII, S. 135.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXII, S. 82.

³⁾ Comptes rendus, Bd. CXXXII, S. 990.

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 178.

⁵⁾ Virchows Archiv, Bd. LXVIII.

Farbe der Chloroformlösung mit der Farbe bekannter Lösungen verglich.

Ferner gab Strauß¹⁾ einen kleinen Apparat zur kolorimetrischen Bestimmung an. Der Harn wird mit Bleizucker gefällt und das Filtrat in einem graduierten Schütteltrichter mit einem gleichen Volumen des Obermayerschen Reagens und mit einer gemessenen Chloroformmenge geschüttelt. Man verdünnt dann die Chloroformlösung, bis ihre Farbe gleich der einer Vergleichslösung reinen Indigoblaues wird.

Diese Methode ist so genau wie etwa die klinische Hämoglobinbestimmung und hängt in sehr hohem Grade ab von der Dauerhaftigkeit der Vergleichslösung. Ferner ist hierbei zu bemerken, daß die ausgeschüttelte Menge immer Indigorot enthält und nicht reinblau wie die Vergleichslösung ist. Dieser Übelstand tritt jedoch wenig hervor, da die Vergleichslösung sehr verdünnt gewählt ist.

Bouma²⁾ schlug vor, mit einer Lösung von Isatin in Salzsäure Indoxyl zu Indigorot zu kondensieren, eine Methode, die von Beyerinck zum Nachweise von Indikan in Pflanzenzellen benutzt war. Der Chloroformauszug einer solchen Lösung wird mit Vergleichslösungen verschiedenen Gehaltes verglichen. Auf den Röhren ist nicht der wirkliche Gehalt angegeben, sondern nur die Hälfte, da bei dieser Methode die doppelte Menge Indigo gebildet wird — 1 Molekül Indoxyl gibt mit 1 Molekül Isatin 1 Molekül Indigo — während sonst der Indigo aus 2 Molekülen Indoxyl entsteht.

Die Bestimmung wird so ausgeführt:

20 ccm Harn werden mit $\frac{1}{10}$ -Volumen Bleiessig gefällt und durch ein trockenes Filter filtriert. Vom klaren Filtrat gießt man $5\frac{1}{2}$ ccm = 5 ccm Harn in ein Proberöhrchen und fügt 10 ccm einer Lösung von 20 mg Isatin in 1 l starker Salzsäure hinzu. Man erhitzt zum Sieden, kocht einige Sekunden, kühlt ab und schüttelt mit 5 ccm Chloroform gut durch. Jetzt macht die kolorimetrische Bestimmung keine Schwierigkeit. Die Vergleichsröhrchen sind im Dunkeln aufzubewahren und das Reagens ist jeden Monat frisch zu bereiten.

Die Resultate dieser Methode waren:

¹⁾ Deutsche medizinische Wochenschrift, 1902, Nr. 16.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXII, S. 82.

| | Titrimetrisch | Kolorimetrisch |
|-----------|---------------|-----------------------|
| Ellinger: | I. 14 mg | Zwischen 10 und 15 mg |
| | II. 11 " | 10—15 " |
| | III. 32 " | 30 " |
| | IV. 5 " | Unter 5 " |
| Bouma: | I. 7,6 " | Zwischen 5 und 10 " |
| | II. 33,0 " | 30—40 " |
| | III. 32,5 " | Etwas über 30 " |
| | IV. 17,6 " | Zwischen 15 und 20 " |

Zuweilen wird die Farbe violett oder blau statt rot, doch kann man nach Bouma¹⁾ diesem Übelstande durch Behandlung des Filtrates mit Schwefelwasserstoff abhelfen.

Diese Boumasche Methode ist sehr elegant und scheint nach Bouma bessere quantitative Verhältnisse als die direkte Bestimmung der Gesamtindigofarbstoffe bei der Wang-Obermayer-Boumaschen Methode zu geben. So liefert die Indigorotmethode 96,4%, die andere Titriermethode 86,8%. Diese letzteren sind aber recht umständlich, da man einige Stoffe, die in das Chloroform übergehen und störend auf die Titration mit Chamäleon wirken, entfernen muß.

Es muß also von großem Vorteil sein, wenn man kolorimetrisch dieselbe Genauigkeit wie titrimetrisch erreichen könnte; aber mit Vergleichsröhrchen wird man dann nicht arbeiten dürfen, selbst wenn man eine große Reihe mit nur je 5 mg Unterschied besäße, da die Farbe keineswegs dauerhaft und daher sehr unzuverlässig ist.

Das Zweckmäßigste ist deshalb die Verwendung einer völlig konstanten Probefarbe. Ist man im Besitze einer solchen, so wird man den titrieranalytischen völlig entsprechende Resultate erzielen können, sogar ohne Entfernung der reduzierenden Stoffe, also bedeutend schneller. Der einzige Mangel einer solchen Methode ist ein möglicher Übergang anderer färbender Bestandteile in das Chloroform.

Bei der Verwendung von Indigoblau als Bestimmungsobjekt entsteht die Schwierigkeit, daß die Farbe bei den im Harn auftretenden Mengen nicht intensiv genug wird, und zugleich wird das unvermeidlich gebildete Indigorot in hohem

¹⁾ Deutsche medizinische Wochenschrift, 1902, Nr. 39.

Grade die Beurteilung stören, wenn man mit leidlich konzentrierten Lösungen arbeitet. Daß man aber trotz der angeführten Schwierigkeiten eine Bestimmung von Indigoblau erreichen kann, haben viele Versuche gezeigt, doch ist die Methode zu wenig wissenschaftlich gestützt, um hier erwähnt zu werden.

In der Isatinmethode dagegen hat man eine Möglichkeit, die Aufgabe kolorimetrisch auf eine wissenschaftlich befriedigende Weise zu lösen; die Färbekraft ist größer und die Farbe völlig rein.

Das benutzte Kolorimeter war das Meislingsche Kolorimeter, wegen dessen näherer Einrichtung ich auf die Zeitschrift für analytische Chemie, Bd. XLIII, S. 138 verweise. Dieses Kolorimeter scheint mir bedeutende Vorteile vor den sonst angewandten, z. B. dem von Wolff, zu haben und ich bin nach zweijährigem täglichen Gebrauch damit völlig zufrieden. Außer zu Hämoglobinbestimmungen, zu denen er meistens in der Klinik verwendet wird, habe ich ihn zu Eisenbestimmungen im Blute,¹⁾ Kupferbestimmungen²⁾ und Jodbestimmungen benutzt. Die Farbe ist absolut dauerhaft und fordert zum Vergleiche keine Probelösung, die jedesmal beim Gebrauche anderer Kolorimeter analysiert werden muß, und schließlich fordert der Apparat nur 1 ccm zur Analyse.

Der Apparat verfügt über alle Spektralfarben + Purpur, keineswegs aber über alle Nuancen. Zur Bestimmung von Indigorot finden sich nun verschiedene Nuancen im Apparate, während dies für Indigoblau nicht der Fall ist.

Den besten Beweis dafür, daß eine Farbe wirklich der Farbe der Lösung entspricht, erhält man, wenn mehrere Reihen von Ablesungen dieselben Durchschnittszahlen für die Schichtdicke geben. Ich führe hier das Resultat von 3 Reihen von je 10 Ablesungen an:

6,54

6,53

6,59

deren Durchschnittszahl 6,55 ist. Dieser Fehler ist sehr gering, da der Apparat nicht Ablesung der Schichtdicke auf mehr als

¹⁾ Zeitschrift für analytische Chemie, Bd. XLIII, S. 147.

²⁾ Zeitschrift für analytische Chemie, Bd. LXIII, S. 356.

eine Dezimale erlaubt. Da geringe Schichtdicke in der Regel die besten Resultate ergibt, führe ich an:

| | | |
|-------|-------|-------|
| 10,69 | 10,74 | 10,71 |
|-------|-------|-------|

deren Durchschnitt 10,71 ist.

Dieselbe Genauigkeit habe ich wie andere Untersucher immer innerhalb der Schichtdicke 5—15 gefunden.

Als Probefarbe habe ich nun 3 verschiedene gewählt, um immer dieselbe Genauigkeit zu erhalten, und zwar nahm ich in meinem Apparate 198,8°, 210° und 216,8°, da diese Schichtdicken ergaben, die sich wie 2 : 3 : 4 verhielten.

Da der Apparat keinen festen Nullpunkt hat, gibt man am besten die Farbe an und zwar als Abstand von der Hämoglobinfarbe, die in meinem Apparate bis 210° war.

Der Abstand wird dann 11,2°, 0° und 6,8°.

Eine sehr wichtige Aufgabe ist die Kalibrierung, die ich mit einer Lösung von Indigorot¹⁾ in Chloroform ausgeführt habe. Der Gehalt der Lösung mußte durch Abdampfen des Chloroforms festgestellt werden, da die gewogene und getrocknete Menge Indigorot nicht völlig in Chloroform löslich war.

Es fand sich in 1 l Chloroform 0,0087 g Indigorot, gewogen mit ca. $\frac{1}{10}$ mg Genauigkeit.

Diese Lösung gab nun folgende Schichtdicke bei den verschiedenen Farben:

| | | |
|--------|-------|--------|
| 216,8° | 210° | 198,8° |
| 25,22 | 18,89 | 12,77 |

Diese Zahlen sind bei 20 Ablesungen in 2 Reihen mit je 10 Ablesungen und Aufgießen für jede Reihe erhalten.

Die 10 Ablesungen gaben folgende Durchschnittszahlen:

| | | |
|--------|-------|--------|
| 216,8° | 210° | 198,8° |
| 25,03 | 18,97 | 12,78 |
| 25,41 | 18,81 | 12,77 |

Um den Gehalt an Indigorot berechnen zu können, hat man nur noch eine Konstante nötig, die folgende ist:

| | | | |
|-----|--------|--------|--------|
| Für | 216,8° | 210° | 198,8° |
| | 219414 | 164343 | 110099 |

¹⁾ Für die Überlassung des benutzten Präparates sage ich hiermit der Badischen Anilin- und Sodafabrik meinen besten Dank.

Die Konstante ergibt sich sehr einfach durch Multiplikation der Schichtdicke mit 0,0087. Durch Division der Schichtdicke in dieser Konstante erhält man dann den Gehalt an Indigorot.

Zur Prüfung der Konstanten nahm ich eine stärkere Lösung unbekannten Gehaltes. Sie ergab folgende Schichtdicke:

| | | | | |
|-----------------|--------|-------|--------|---------------------|
| | 216,8° | 210° | 198,8° | |
| | 12,04 | 9,14 | 6,05 | |
| | 12,06 | — | — | |
| Indigorot in mg | 18,21 | 17,99 | 18,19 | Durchschnitt 18,13. |

Die Analyse ergab 18,1 mg Indigorot.

Der Unterschied im Befunde bei den einzelnen Nuancen war also in diesem Falle 0,2 mg und die Mittelzahl zeigte keine Abweichung von der durch Abdampfen erhaltenen Zahl, bei den einzelnen Nuancen dagegen nur 0,1 mg Differenz.

Die Abweichung in der Ablesung beträgt nur 1,1%, während die größte Abweichung von dem wirklichen Gehalte nur 0,7% ist.

Wenn nun die Probelösung ungenau wäre, z. B. 8,6 oder 8,8 mg statt 8,7 enthielte, so würde ein Fehler von 1,2% entstehen. Der gesamte Fehler würde dann 2,3% werden, oder man könnte auf diese Weise im ungünstigsten Falle 97,7% des vorhandenen Indigorotes finden, während die Titrierung nur einen Gehalt von 96,4% ergab.

Die Methode kann also mit der Titrierung an Genauigkeit konkurrieren und ist ihr an Schnelligkeit weit überlegen. Was die Umsetzung mit Isatin betrifft, so will ich nur bemerken, daß sie leicht vor sich geht und daß die wenigen Fälle, wo die Farbe einen bläulichen Ton hat, leicht durch Verwendung von Schwefelwasserstoff brauchbar gemacht werden können.

Anfangs benutzte ich ein weniger reines Isatin, das keine glatte Umsetzung hervorrief; seitdem ich Isatin Merck gebrauche, habe ich keine Schwierigkeiten mehr gehabt.

Man sieht leicht ein, daß man bei Verwendung der stärksten Farbe 216,8° nicht mehr wie 40 mg bestimmen kann, da die niedrigste Schichtdicke 5 ist, solange man das Verhältnis 5 Teile Harn zu 5 Teilen Chloroform beibehält. Bei größeren Mengen wird man also vorteilhaft die doppelte Menge

Chloroform nehmen. Das Verfahren ist sonst das von Bouma angegebene.

Zum Schluß ein paar Beispiele:

| | |
|------------|-------------|
| 216,8° | 198,8° |
| 7,6 | 6,1 |
| 7,7 | 6,3 |
| 7,6 | 5,9 |
| 7,8 | 5,9 |
| 7,8 | 6,1 |
| 7,9 | 5,7 |
| 7,4 | 5,7 |
| 7,5 | 5,8 |
| 7,6 | 5,9 |
| 7,8 | 6,1 |
| <u>7,7</u> | <u>5,95</u> |
| F: 28,5 mg | F: 18,5 mg |

Der Gehalt dieser Harn ist dann 14,25 mg und 9,25 mg Indican in 1000 ccm. Ein diabetischer Harn (Tagesmenge 4380) gab 17,23 bei 210° = 6,4 mg oder für den Tag 27,9 mg Indigorot = 13,95 mg Indican, was der normalen Menge, die zwischen 10—15 mg Indican liegt, entspricht.

Über den Ursprung des Cholehämätins (Bilipurpurins).

Von

L. Marchlewski.

(Der Redaktion zugegangen am 15. Juli 1906.)

In meinen früheren Mitteilungen habe ich nachgewiesen, daß Cholehämatin resp. Bilipurpurin mit dem von mir aus den Faeces von mit frischem Grase gefütterten Kühen isolierten Phylloerythrin identisch ist. Es erübrigte noch, nachzuweisen, daß Cholehämatin (Bilipurpurin) in der Galle von Pflanzenfressern nur dann vorhanden ist, wenn die Tiere mit frischer grüner Nahrung genährt werden. Diesen Beweis bin ich in der Lage jetzt zu bringen.

Ein mit einer Gallenfistel versehenes Schaf, welches ich der Liebenswürdigkeit meines geehrten Kollegen Prof. Dr. N. Cybulski verdanke, wurde mit frischem Grase gefüttert. In der in einem kleinen Gummibalg gesammelten Galle gelang es mit Leichtigkeit, die Anwesenheit des Phylloerythrins bzw. Cholehämätins oder Bilipurpurins nachzuweisen. Zu dem Zwecke wird die Galle auf dem Wasserbade bis zur Sirupkonsistenz eingedampft, mit absolutem Alkohol versetzt, gut durchgerührt und filtriert. Das Filtrat wird dann eingedampft, in Wasser gelöst, mit Schwefelsäure angesäuert und mit Äther extrahiert. Die ätherische Lösung ist prachtvoll rot gefärbt und zeigt die vier charakteristischen Absorptionsbänder, die ich bereits mehrfach beschrieben habe. Im Ultraviolett lassen sich auf photographischem Wege die bekannten zwei Phylloerythrinbänder nachweisen.

Nachdem dies konstatiert war, erhielt das Tier trockene Nahrung, die chlorophyllfrei war. Die Menge der abgesonderten Galle verminderte sich hierbei sehr bedeutend und die nach je zwei Tagen gesammelten Proben wurden, wie oben angegeben,

auf Phylloerythrin geprüft. Es zeigte sich, daß der Farbstoff erst sehr allmählich aus dem Organismus entfernt wird. Nach acht Tagen war die Menge desselben bereits sehr gering und betrug in einer zweitägigen Portion kaum 0,0005 g (kolorimetrisch bestimmt). Am 10. Tage war in der Galle keine Spur des Phylloerythrins mehr wahrzunehmen. Nun erhielt das Tier noch während zweier weiteren Tage nur chlorophyllfreie Nahrung, und nachdem die Untersuchung der Galle wieder die Abwesenheit des Phylloerythrins ergab, begann wieder das Füttern mit frischer Nahrung. Schon am Schlusse des zweiten Tages, nach welcher Zeit zum ersten Male wieder geprüft wurde, enthielt die Galle verhältnismäßig viel Phylloerythrin.

Aus diesen Versuchen, deren mehr detaillierte Beschreibung ich für später aufschieben muß, folgt zweifellos der Schluß, daß Cholehämatin resp. Bilipurpurin mit dem Blutfarbstoff resp. Gallenfarbstoffen nichts zu thun hat,¹⁾ sondern ein Abkömmling des Chlorophylls ist und aus diesem auf noch unbekannte Art im Organismus produziert wird. Daher darf ich wohl hoffen, daß in Zukunft die irreführenden Namen Cholehämatin und Bilipurpurin fallen gelassen werden und nur der von mir vorgeschlagene «Phylloerythrin» beibehalten wird.

Ausführlichere Mitteilung über dieses Thema behalte mir vor.

Krakau, den 12. Juli 1905.

¹⁾ Abgesehen natürlich davon, daß alle vom Hämopyrrol abstammen, wie der Blutfarbstoff und Chlorophyll selbst.

Ausscheidung von Tyrosin und Leucin in einem Falle von Cystinurie.

Von

Emil Abderhalden und Alfred Schittenhelm.

(Aus dem I. Chemischen Institut der Universität Berlin und der Medizinischen Klinik in Göttingen.)

(Der Redaktion zugegangen am 19. Juli 1905.)

Der Cystinurie liegt höchst wahrscheinlich eine Störung des bis jetzt so wenig erforschten und gekannten intermediären Eiweißstoffwechsels zugrunde. Auffallend ist, daß sich diese einzig allein auf das Cystin erstreckt, während, soviel bis jetzt bekannt ist, die übrigen Bausteine des Eiweißmoleküls auch vom Cystinuriker in normaler Weise verwandt resp. abgebaut werden; denn bisher sind unseres Wissens bei der Cystinurie außer den unkonstant auftretenden Diaminen, deren Bildungsstätte noch zweifelhaft ist, keine anderen Aminosäuren beobachtet worden. Es kann dies wohl daran liegen, daß bisher eine eingehende Untersuchung auf solche im Cystinharn nicht erfolgt ist. Wir kommen zu dieser Vermutung, weil es uns geglückt ist, im Harne eines an Cystinurie leidenden Patienten mit Leichtigkeit Tyrosin und Leucin sicher nachzuweisen, und wir nach dem Verhalten der isolierten Produkte wohl schließen dürfen, daß noch andere Aminosäuren in kleinen Mengen zugegen waren. Daß Tyrosin neben Cystin im Harne vorkommt, beweist ferner der Befund dieser beiden Aminosäuren in einem Cystinstein.¹⁾ Mit der Auffindung weiterer Eiweißspaltprodukte im Urin des Cystinurikers klärt sich die ganze Auffassung der Cystinurie. Wir haben keine vereinzelte, auf einen einzigen Komplex beschränkte Anomalie des Eiweißstoffwechsels vor uns,

¹⁾ Emil Fischer und Suzuki, Zur Kenntnis des Cystins. Diese Zeitschrift, Bd. XLV, S. 405, 1905.

sondern vielmehr eine mehr allgemeine Störung des Eiweißabbaus. Es bleibt abzuwarten, ob auch bei anderen Fällen von Cystinurie außer Cystin andere Aminosäuren auftreten. Wir hoffen weitere Fälle von Cystinurie nach dieser Richtung hin untersuchen zu können.

Der untersuchte Harn stammt von einem 34 Jahre alten Manne aus gesunder Familie. Er selbst erkrankte mit dem 16. Jahre an Blasensteinen, die operativ entfernt wurden (drei Steine von Kirschengröße). Einige Jahre später wurde ein leichter Blasenkatarrh konstatiert, welcher jetzt noch vorhanden ist. Ab und zu gehen kleine Steinchen mit dem Urin ab.

Der Urin ist hellgelb, ziemlich klar. Beim Stehen scheidet sich ein Sediment ab, das aus den typischen sechseckigen Tafeln des Cystins besteht, daneben finden sich vereinzelte Blasenepithelien, Harnsäurekristalle und oxalsaurer Kalk. Die Reaktion des Urins ist sauer, er enthält keinen Zucker, dagegen hin und wieder Spuren von Eiweiß. Die Tagesmengen schwanken zwischen 2000 und 2500 ccm. Das spezifische Gewicht beträgt 1012—1015. Dieser Befund ist stets ziemlich konstant, nur schwanken die Cystinmengen. So wurden z. B. in einer Tagesportion von 2100 ccm bei einem Gesamt-N von 16,6 g 0,31 g Cystin und 0,5 g Harnsäure isoliert. Das Filtrat des im Vacuum zur Abscheidung des Cystins mit Eisessig stark eingeeengten Harns gab starke Reaktion mit Millons Reagens. Diese gab übrigens auch der Harn direkt. In einer anderen Tagesmenge von 2500 ccm und einem Gesamt-N von 12,0 g wurden 0,4 g Cystin erhalten. Auch dieser Urin gab sehr starke Rotfärbung mit Millons Reagens. Auch das Sediment des Urins gab die Reaktion, wenn auch in schwächerem Maße.

Zur Isolierung des Tyrosins wurden mehrere Tagesportionen des Harns unter vermindertem Druck bei 40° solange eingeeengt, bis eine Probe nach einigem Stehen unter Kühlung einen beträchtlichen Niederschlag gab, der mit Millons Reagens nur wenig reagierte und hauptsächlich aus Cystin bestand. Nachdem das Ausgeschiedene abgesaugt war, wurde das Filtrat weiter eingeeengt, bis wiederum beim Stehen in der Kälte Kristallisation erfolgte. Diese gab starke Rotfärbung mit Millons

Reagens und bestand zum größten Teil aus Tyrosin. Beide Kristallisationen wurden zur Reinigung in wenig 10%igem Ammoniak heiß gelöst und dann stark gekühlt. Es schieden sich hierbei aus der zweiten Portion Kristalle ab, die abgesaugt wurden. Zum Filtrat resp. bei der ersten Portion zur ammoniakalischen Lösung wurde nun vorsichtig soviel Eisessig tropfenweise zugefügt, daß die Reaktion eben noch alkalisch blieb.¹⁾ Es entstand besonders in der zweiten Portion sehr bald eine kristallinische Fällung, die sofort abgesaugt wurde. Dieser Niederschlag erwies sich als schon recht reines Tyrosin, das nach zweimaligem Umkristallisieren aus heißem Wasser die richtigen Analysenzahlen gab:

| | |
|--|-----------------------|
| 0,1809 g Substanz gaben 0,3968 g CO ₂ und 0,1011 g H ₂ O | |
| Berechnet für C ₉ H ₁₁ NO ₃ : | Gefunden: |
| 59,66% C und 6,07% H. | 59,82% C und 6,21% H. |

Die schwach alkalischen, von Tyrosin befreiten Filtrate wurden vereinigt und nun mit Eisessig stark übersättigt. Die Lösung blieb längere Zeit völlig klar und trübte sich dann rasch unter Abscheidung eines sandigen Niederschlages. Er gab noch eine ganz schwache, eben wahrnehmbare Rotfärbung mit Millons Reagens. Zur Reinigung wurde das Cystin noch zweimal in 10%igem Ammoniak gelöst und gefällt.

| | |
|---|-----------------------|
| 0,1715 g Substanz gaben 0,1869 g CO ₂ und 0,0750 g H ₂ O | |
| Berechnet für C ₆ H ₁₁ N ₂ S ₂ O ₄ : | Gefunden: |
| C 30,00% und H 5,00%. | 29,72% C und 4,80% H. |

Der in der Hauptsache von Cystin und Tyrosin befreite Urin, der allerdings noch recht deutliche Millonsche Reaktion zeigte, aber auch beim sehr starken Einengen keine Tyrosinkristalle mehr gab, wurde nun mit normaler Natronlauge schwach alkalisch gemacht und mit der ätherischen Lösung von 5 g β -Naphtalinsulfochlorid geschüttelt. Jede halbe Stunde wurde die Reaktion geprüft und stets schwach alkalisch gehalten.²⁾

¹⁾ Vergl. E. Friedmann, Beiträge zur Kenntnis der physiologischen Beziehungen der schwefelhaltigen Eiweißabkömmlinge, Hofmeisters Beiträge, Bd. III, S. 15, 1902.

²⁾ Stark alkalische Reaktion ist zu vermeiden, es kann das in größeren Mengen entstehende β -Naphtalinsulfoamid leicht zu unangenehmen Täuschungen Anlaß geben.

Der Äther wurde nach 4stündigem Schütteln abgetrennt, die alkalische Lösung filtriert und nun mit fünffach normaler Salzsäure angesäuert. Es fiel ein zunächst ölig, auf Eis jedoch bald erstarrender Niederschlag. Er wurde wieder in normaler Natronlauge gelöst und nochmals gefällt. Das erhaltene Produkt machte nicht den Eindruck einer einheitlichen Substanz. Es wurde im Vacuumexsikkator über Schwefelsäure getrocknet, dann fein zerrieben und mit Äther ausgelaugt. Der größte Teil der Substanz ging in Lösung. Beim Abdunsten des Äthers hinterblieb ein ölig, Rückstand, der allmählich erstarrte. Aus 20%igem Alkohol wiederholt umkristallisiert, wurden schließlich dünne, langgestreckte prismatische Kristalle erhalten, die bei 62° (korr.) anfangen zu sintern und bei 70° (korr.) völlig schmolzen. Zur Analyse wurde die Substanz bei 85° getrocknet.

0,1910 g Substanz gaben 0,4146 g CO₂ und 0,0977 g H₂O

| | |
|---------------------|--|
| Gefunden: | Berechnet für C ₁₆ H ₁₉ O ₄ NS: |
| 59,2% C und 5,6% H. | 59,81% C und 5,92% H. |

Es lag somit Leucin¹⁾ vor.

Bei Wiederholung des Versuches wurde dasselbe Resultat erhalten.

0,1881 g Substanz gaben 0,4143 g CO₂ und 0,0953 g H₂O

Gefunden: 60,06% C und 5,63% H.

Der in Äther unlösliche Teil konnte trotz aller Sorgfalt nicht in einheitlich kristallisierende Fraktionen getrennt werden.

Ob neben dem Tyrosin noch Substanzen vorhanden waren, welche mit dem Millonschen Reagens reagierten, können wir nicht entscheiden. Jedenfalls blieb auch im Filtrat der Tyrosinausscheidung, aus dem kein Tyrosin mehr isoliert werden konnte, die Millonsche Probe positiv, nachdem der verdünnte Harn mit Salzsäure stark angesäuert, gekocht und mit Äther ausgeschüttelt worden war.

Tyrosin scheint nach den Beobachtungen des einen von uns²⁾ nicht so selten im Urin aufzutreten. Wir hatten Gelegen-

¹⁾ Emil Fischer und Peter Bergell, Über die β -Naphtalinsulfoderivate der Aminosäuren, Berichte der Deutschen Chem. Gesellschaft, Jg. XXXV, S. 3783, 1902.

²⁾ Emil Abderhalden, Abbau und Aufbau der Eiweißkörper im tierischen Organismus, Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 50, 1906.

heit, drei weitere Urinproben zu untersuchen, die alle drei ausgesprochene Millonsche Reaktion gaben. Die eine Portion stammte von einer an schwerem Icterus leidenden älteren Frau, bei der offenbar totaler Verschuß des Ductus choledochus vorlag. Der zweite Urin, der ebenfalls sehr intensive Millonsche Probe gab, rührte von einem Patienten her, der eine schwere Narkose durchgemacht hatte (verbraucht ca. 30 g Chloroform und 200 g Äther). Endlich wurde noch der Harn eines jugendlichen Diabetikers untersucht. Während in den beiden ersten Fällen Tyrosin isoliert werden konnte, gelang dies in letzterem Falle nicht. Nach dem Ausfall der β -Naphtalinsulfureaktion in diesen Fällen könnte man zur Vermutung kommen, daß das Tyrosin allein oder doch hauptsächlich zur Ausscheidung gelangt sei, während die übrigen Aminosäuren normalerweise verbrannt worden wären. Dieser Befund wirft vielleicht auch einiges Licht auf das Wesen der Alkaptonurie, bei der ja auch im wesentlichen das Tyrosin (neben Phenylalanin) beteiligt zu sein scheint. Weitere Untersuchungen und weitere Beobachtungen auf diesem Gebiete werden gewiß berufen sein, uns einen Einblick in den Stoffwechsel des Eiweißes jenseits des Darmes zu geben.

Die Zusammensetzung von aus Kiefern Samen dargestelltem Eiweiß.

Von

Emil Abderhalden und Yutaka Teruchi, Tokio.

(Aus dem I. Chemischen Institut der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 21. Juli 1905.)

Von Pflanzeneiweißstoffen ist bis jetzt nur die Gruppe der Edestine genau auf ihre Zusammensetzung untersucht. Es schien uns von Interesse, Vertreter anderer Klassen von Eiweißkörpern pflanzlichen Ursprungs abzubauen, um so allmählich einen Überblick über den Aufbau der verschiedenartigsten Eiweißarten zu erhalten. Wenn wir auch vorläufig nicht in der Lage sind, die einzelnen Spaltprodukte quantitativ zu bestimmen, so erhalten wir doch relative Werte, welche recht gut vergleichbar sind. Die vergleichende Untersuchung der verschiedenartigsten Eiweißstoffe gibt uns eine wesentliche Grundlage für die Auffassung des ganzen Verdauungsprozesses und speziell die Assimilation des Nahrungseiweißes zu Körpereiweiß, wie der eine von uns bereits eingehend erörtert hat.¹⁾

Das zu dem vorliegenden Versuche dienende Eiweiß war aus Kiefern Samen (*Picea excelsa*) dargestellt. Die zerkleinerten, fein gemahlenen, entfetteten Samen wurden mit sehr verdünntem Alkali extrahiert, und dann aus den vereinigten Extrakten das Eiweiß mit Essigsäure gefällt. Der ganze Prozeß wurde mehrmals wiederholt, und schließlich das so gereinigte Eiweiß mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen und an der Luft getrocknet.

500 g Eiweiß mit einem Wassergehalt von 6,4%^o, einem Aschengehalt von 2,6%^o und einem Humingehalt von 15%^o

¹⁾ Emil Abderhalden, Abbau und Aufbau der Eiweißkörper im tierischen Organismus, Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 17, 1905.

(also rund 380 g Eiweiß) wurden 6 Stunden mit 1800 ccm rauchender Salzsäure (spez. Gew. 1,19) am Rückflußkühler gekocht. Aus der erkalteten Lösung fielen größere Mengen von «Huminsubstanzen» aus, die abfiltriert wurden. Das Filtrat wurde in gewöhnlicher Weise unter vermindertem Druck bis zur Sirupkonsistenz eingeeengt, und hierauf die Masse in zwei Portionen mit Alkohol und gasförmiger, trockener Salzsäure wiederholt verestert. Die Ester wurden aus den Hydrochloraten in der gewohnten Weise in Freiheit gesetzt, und die Ester fraktioniert destilliert, wobei folgende Fraktionen erhalten wurden:

| | | |
|--|-----------------|--------|
| 0—60° (Temperatur des Wasserbades) | bei 12 mm Druck | = 40 g |
| 0—105° (» » Ölbad) | » 0,6 » » | = 75 » |
| 105—180° (» » ») | » 0,6 » » | = 80 » |

Im Destillationskolben hinterblieb ein beim Abkühlen bald erstarrender, dunkelbraun gefärbter Rückstand.

Die Verarbeitung der einzelnen Fraktionen erfolgte in der bereits wiederholt beschriebenen Weise, weshalb hier Einzelheiten nicht angeführt werden.

I. Fraktion.

Sie wurde mit dem sechsfachen Volumen Wasser 6 Stunden am Rückflußkühler gekocht und dann zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde fein gepulvert, in absolutem Alkohol suspendiert und trockenes Salzsäuregas bis zur völligen Sättigung eingeleitet. Nach dem Einimpfen eines Kriställchens von Glycocollesterchlorhydrat erfolgte nach einigem Stehen auf Eis bald Kristallisation. Erhalten wurden auf freies Glycocoll umgerechnet 1,5 g Glycocoll.

0,1984 g Substanz gaben 0,2525 g CO₂ und 0,1300 g H₂O

Berechnet für C₄H₁₀NO₂Cl:

Gefunden:

34,41% C und 7,17% H.

34,71% C und 7,28% H.

Die Mutterlauge vom Glycocollesterchlorhydrat wurde durch Kochen mit gelbem Bleioxyd von der Salzsäure befreit. Durch Einengen der durch Schwefelwasserstoff von gelöstem Blei befreiten Lösung wurden 0,5 g Alanin vom Schmelzpunkt 295° (korr.) erhalten.

II. Fraktion.

Nach stattgehabter Verseifung durch 7 stündiges Kochen mit der sechsfachen Menge Wasser wurde diese Fraktion, aus der bereits beim Abkühlen Leucin ausfiel, nach Absaugen des Ausgeschiedenen zur Kristallisation eingeengt. Die einzelnen Fraktionen wurden zur Gewinnung der α -Pyrrolidincarbonsäure mit absolutem Alkohol ausgekocht. Aus den einzelnen Fraktionen wurden erhalten: 23,5 g Leucin, 6,3 g Alanin, 0,8 g Glykokoll und 2,1 g eines Produktes, dessen Analysenzahlen auf Aminovaleriansäure hinweisen.

Das Leucin schmolz bei 297° (korr.).

| | |
|--|-----------------------|
| 0,1815 g Substanz gaben 0,3649 g CO_2 und 0,1623 g H_2O | |
| Berechnet für $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_2$: | Gefunden: |
| 54,96% C und 9,92% H. | 54,83% C und 9,94% H. |

Das isolierte Alanin schmolz bei 295° (korr.).

| | |
|--|-----------------------|
| 0,1854 g Substanz gaben 0,2740 g CO_2 und 0,1289 g H_2O | |
| Berechnet für $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2$: | Gefunden: |
| 40,45% C und 7,87% H. | 40,31% C und 7,72% H. |

Vom rohen Alanin wurde eine Fraktion von 2,1 g abgetrennt, die folgende Analysenzahlen gab:

| | |
|--|-----------------------|
| 0,1898 g Substanz gaben 0,3505 g CO_2 und 0,1593 g H_2O | |
| Berechnet für $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2$: | Gefunden: |
| 51,28% C und 9,40% H. | 50,36% C und 9,32% H. |

Offenbar liegt eine noch mit etwas Alanin und vielleicht auch mit Leucin verunreinigte Aminovaleriansäure vor.

Aus dem in Alkohol löslichen Teil der Fraktionen wurde in üblicher Weise das Prolin als Kupfersalz isoliert, und das aktive Prolinkupfer vom racemischen durch Auskochen mit absolutem Alkohol abgetrennt. Erhalten wurden 9,9 g aktives Prolinkupfer und 3,3 g bei 120° getrocknetes racemisches Prolinkupfer. Identifiziert wurde das aus dem racemischen Kupfersalz durch Zerlegung mit Schwefelwasserstoff in Freiheit gesetzte Prolin durch die Darstellung der Phenylisocyanatverbindung bzw. deren Anhydrid.¹⁾ Aus heißem Wasser umkristallisiert schmolz die Verbindung bei 118° (korr.).

¹⁾ Emil Fischer, Über die Hydrolyse des Caseins durch Salzsäure. Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 167, 1901.

0,1756 g Substanz gaben 0,4268 g CO_2 und 0,0879 g H_2O
 Berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_2\text{N}_2$: Gefunden:
 66,67% C und 5,57% H. 66,28% C und 5,56% H.

III. Fraktion.

Diese enthielt die Ester des Phenylalanins, der Glutaminsäure, der Asparaginsäure und des Serins. Der erstere wurde, wie üblich, sofort nach der Destillation der Ester mit Äther aus dem mit Wasser versetzten Estergemisch abgetrennt, der Äther zur Entfernung der mitgelösten übrigen Ester mehrmals mit Wasser gewaschen, getrocknet und dann verdampft. Der Rückstand wurde dann mit Salzsäure übergossen und zur Trockene verdampft. Aus dem salzsauren Phenylalanin wurde die freie Säure durch dessen Auflösen in Ammoniak, Eindampfen der Lösung und Auslaugen des gebildeten Chlorammons mit kaltem Wasser dargestellt. Erhalten wurden 4,4 g Phenylalanin. Zur Identifizierung diente das Anhydrid der Isocyanatverbindung:¹⁾

0,1833 g Substanz gaben 0,4836 g CO_2 und 0,0870 g H_2O
 Berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_2\text{N}_2$: Gefunden:
 72,18% C und 5,26% H. 71,95% C und 5,27% H.

Die vereinigten wässrigen Lösungen wurden durch dreistündiges Kochen mit Barytlösung auf dem Wasserbade verseift. Nach einiger Zeit schied sich asparaginsaurer Baryt ab, der abgesaugt und mit Schwefelsäure zersetzt wurde. Die Ausbeute an reiner Asparaginsäure betrug 5,0 g.

0,1840 g Substanz gaben 0,2446 g CO_2 und 0,0880 g H_2O
 Berechnet für $\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}_4$: Gefunden:
 36,09% C und 5,26% H. 36,25% C und 5,27% H.

Aus dem Filtrat vom asparaginsauren Baryt wurde der Baryt quantitativ mit Schwefelsäure gefällt, das Filtrat vom Baryumsulfat stark eingengt und mit Salzsäuregas gesättigt. Nach längerem Stehen erfolgte reichliche Abscheidung von Glutaminsäurechlorhydrat. Auf freie Säure berechnet 20,7 g Glutaminsäure.

0,1802 g Substanz gaben 0,2176 g CO_2 und 0,0940 g H_2O
 Berechnet für $\text{C}_6\text{H}_9\text{NO}_4\text{Cl}$: Gefunden:
 32,69% C und 5,45% H. 32,93% C und 5,79% H.

¹⁾ Emil Fischer, l. c. S. 172.

Die Mutterlauge vom Glutaminsäurechlorhydrat wurde so-
dann zur Entfernung der Salzsäure mit Bleioxyd gekocht. Durch
Einengen der vom gelösten Blei mittels Schwefelwasserstoff
befreiten Lösung wurden 2,0 g Asparaginsäure gewonnen und
aus deren Mutterlauge 0,3 g reines Serin.

| |
|--|
| 0,1789 g Substanz gaben 0,2269 g CO_2 und 0,1093 g H_2O |
| Berechnet für $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_3$: Gefunden: |
| 34,28% C und 6,66% H. 34,59% C und 6,79% H. |

Rückstand.

Der bei der Destillation der Ester im Destillationskolben
verbleibende Rückstand wurde in heißem Wasser gelöst und
mit 200 g Baryt mehrere Stunden am Rückflußkühler gekocht,
dann der Baryt quantitativ mit Schwefelsäure entfernt, und das
Filtrat vom Baryumsulfat stark eingengt und mit gasförmiger
Salzsäure gesättigt. Nach einigem Stehen auf Eis schied sich
reichlich Glutaminsäurechlorhydrat ab. Ausbeute auf reine
Glutaminsäure berechnet 8,8 g.

Nach Entfernung der Salzsäure wurde beim Einengen eine
dem Leucin sehr ähnlich sehende Kristallisation erhalten.

| |
|---|
| 0,1707 g Substanz gaben 0,3383 g CO_2 und 0,1492 g H_2O |
| Berechnet für $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NO}_3$: Gefunden: |
| 54,96% C und 9,92% H. 54,05% C und 9,71% H. |

Ihre Menge betrug 0,8 g.

Bestimmung des Tyrosins.

200 g Eiweiß (nach Abzug von Asche, Wasser, Humin-
substanz) wurden mit 3 l 25%iger Schwefelsäure 12 Stunden
am Rückflußkühler gekocht und dann in der bekannten Weise
das Tyrosin durch Kristallisation gewonnen. Es wurden 3,4 g
reines Tyrosin erhalten.

| |
|--|
| 0,1869 g Substanz gaben 0,4075 g CO_2 und 0,1035 g H_2O |
| Berechnet für $\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_3$: Gefunden: |
| 59,66% C und 6,07% H. 59,46% C und 6,15% H. |

Nachweis des Tryptophans.

10 g Eiweiß wurden in 50 ccm Wasser suspendiert und
nach Zusatz von Toluol und aktiviertem Pankreassaft 10 Tage

bei 36° aufbewahrt. Die Verdauungsflüssigkeit zeigte mit Bromwasser sehr deutliche Tryptophanreaktion.

Ein Versuch, nach der üblichen Methode Cystin zu gewinnen, führte zu keiner Abscheidung. Der Versuch soll an größeren Eiweißmengen wiederholt werden.

Wie die vorliegende Untersuchung zeigt, enthält auch das aus Piniensamen dargestellte Eiweiß dieselben Bausteine, wie alle übrigen bis jetzt untersuchten Eiweißkörper. In der quantitativen Zusammensetzung zeigen sich, wie bereits wiederholt hervorgehoben, zwischen den einzelnen Eiweißarten große Unterschiede. Auf 100 g reines Eiweiß berechnen sich:

| | |
|--------------------|------------|
| Glycocoll | 0,6 % |
| Alanin | 1,8 % |
| Aminovaleriansäure | vorhanden |
| α -Prolin | 2,8 % |
| Leucin | 6,2 % |
| Glutaminsäure | 7,8 % |
| Asparaginsäure | 1,8 % |
| Phenylalanin | 1,2 % |
| Serin | 0,08 % |
| Tyrosin | 1,7 % |
| Tryptophan | vorhanden. |

Nach E. Schulze und E. Winterstein¹⁾ enthält das Kiefernnsameneiweiß 0,62 % Histidin, 10,9 % Arginin und 0,25 % Cystin.

¹⁾ E. Schulze und E. Winterstein, Über die Ausbeute an Hexonbasen, die aus einigen pflanzlichen Eiweißstoffen zu erhalten ist. Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 547 (557), 1901.

Beitrag zur Kenntnis der Zusammensetzung des Conglutins aus Samen von Lupinus.

Von

Emil Abderhalden und J. B. Herrick, Chicago.

(Aus dem I. Chemischen Institut der Universität Berlin.)
(Der Redaktion zugegangen am 23. Juli 1906.)

Im Vergleich zu den bis jetzt untersuchten Eiweißkörpern schien es uns nicht ohne Interesse, Vertreter weiterer Gruppen von Pflanzeneiweißstoffen zu untersuchen, speziell auch in Hinsicht auf Fragen nach der Bildung und Umwandlung der Eiweißstoffe im pflanzlichen Organismus. Die Methode der Veresterung der Aminosäuren kombiniert mit der direkten Bestimmung der entweder direkt oder durch charakteristische Verbindungen isolierbaren Eiweißabbauprodukte (Glycocoll als Glycocollesterchlorhydrat, Glutaminsäure als Chlorhydrat, Tyrosin und die basischen Spaltprodukte) wird ohne Zweifel bei der systematischen Untersuchung der Eiweißstoffe von Samen und Keimlingen verschiedenen Alters uns einen Einblick in die sich vollziehenden Umwandlungen und damit in den Eiweiß-Ab- und -Aufbau der Pflanze geben. Untersuchungen in dieser Richtung sind bereits im Gange.

Zu der vorliegenden Hydrolyse diente nach Ritthausen aus Lupinensamen dargestelltes, sorgfältig gereinigtes Eiweiß. Es gilt für diesen, unter dem Namen Conglutin bekannten Eiweißkörper, wie überhaupt für fast alle und vielleicht auch für alle bis jetzt untersuchten Eiweißsubstanzen die Bemerkung, daß irgendwelche Kriterien für die Einheitlichkeit des angewandten Produktes nicht vorhanden sind. Der untersuchte Eiweißkörper ist nur charakterisiert durch seine Darstellungsmethode und seine Herkunft.

Bei der Spaltung des Conglutins durch rauchende Salzsäure wurden mit Hilfe der Estermethode isoliert: Glycocoll, Alanin, Leucin, Aminovaleriansäure, Prolin, Phenylalanin, Asparaginsäure und Glutaminsäure. Tyrosin wurde in einer Probe durch Hydrolyse mit 25%iger Schwefelsäure ebenfalls nachgewiesen, seine Menge jedoch nicht bestimmt; ebenso wurde auf Cystin auch nur qualitativ in einer Probe der mit kochender Salzsäure hergestellten Hydrolysenflüssigkeit geprüft. Ferner wurde eine Probe des Conglutins in Wasser suspendiert und mit Toluol und Pankreassaft 10 Tage im Brutraum aufbewahrt. Sie gab mit Bromwasser ausgesprochene Tryptophanreaktion. Von E. Schulze und E. Winterstein sind früher¹⁾ schon im Conglutin Histidin (0,63%), Arginin (6,9%) und Lysin (2,1%) nachgewiesen worden.

Es zeigt sich auch hier, daß das Conglutin dieselben Spaltprodukte aufweist, wie alle bis jetzt untersuchten komplizierten Eiweißarten. Es wird von Interesse sein, die Zusammensetzung des Conglutins speziell, was die Mengenverhältnisse der einzelnen Aminosäuren anbetrifft, mit anderen auf dieselbe Art dargestellten Eiweißstoffen aus Samen anderer Pflanzenarten zu vergleichen. Herr Dr. Boris Babkin wird demnächst über die Zusammensetzung des Legumins berichten.

In der vorliegenden Untersuchung wurden 400 g asche- und wasserfreies Conglutin aus Lupinensamen (der Wassergehalt des verwendeten Materiales betrug 8% und sein Aschegehalt 0,65%) mit der dreifachen Menge rauchender Salzsäure am Rückflußkühler 6 Stunden gekocht. Es fand fast keine Ausscheidung von «Melaninen» statt. Die Hydrolysenflüssigkeit wurde nun, wie üblich, eingedampft, der Rückstand mit absolutem Alkohol übergossen, gasförmige, trockene Salzsäure bis zur Sättigung eingeleitet, und dieser letztere Prozeß nach jedesmaligem Eindampfen der Flüssigkeit unter vermindertem Druck und einer 40° nicht übersteigenden Temperatur noch zweimal

¹⁾ E. Schulze und Winterstein: Über die Ausbeute an Hexonbasen, die aus einigen pflanzlichen Eiweißstoffen zu erhalten ist. Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 547, 1901.

wiederholt. Die Ester wurden in der bekannten Weise in Freiheit gesetzt. Die Destillation der Ester ergab folgende Fraktionen:

| | | | | |
|-------------|----------|---------------------------------|---|---------|
| Fraktion I. | 0—60° | des Wasserbades und 12 mm Druck | = | 18,4 g |
| „ II. | 60—100° | „ „ „ 12 „ „ | = | 33,8 „ |
| „ III. | 100—105° | „ Ölbad „ 0,6 „ „ | = | 44,7 „ |
| „ IV. | 105—200° | „ „ „ 0,6 „ „ | = | 112,0 „ |

Im Destillationskolben verblieb eine beim Abkühlen völlig festwerdende dunkelbraun gefärbte, zähe Masse. Ihr Gewicht betrug 77 g.

Die einzelnen Fraktionen wurden in der üblichen Weise durch fraktionierte Kristallisation, Darstellung von Kupfersalzen usw. zerlegt.

Fraktion I.

Sie bestand zum größten Teil aus Alkohol. Sie wurde mit dem gleichen Volumen konzentrierter Salzsäure übergossen und auf dem Wasserbad völlig zur Trockene verdampft. Der kristallinische Rückstand wurde mit 10 ccm absolutem Alkohol übergossen und bis zur völligen Sättigung trockenes Salzsäuregas eingeleitet. Nach dem Abkühlen der Flüssigkeit wurde ein Kriställchen von Glycocollesterchlorhydrat eingetragen. Nach kurzer Zeit erfolgte beim Stehen auf Eis reichliche Kristallisation. Die Menge des isolierten Glycocolls (umgerechnet vom Glycocollesterchlorhydrat) betrug 2,5 g. Das Filtrat vom Glycocollesterchlorhydrat wurde in der üblichen Weise durch Kochen mit gelbem Bleioxyd von der Salzsäure befreit. Es enthielt Alanin vom Schmelzpunkt 293° (korr.). Seine Menge betrug 2,0 g.

Fraktion II.

Sie wurde nach der Verseifung durch 7stündiges Kochen mit dem sechsfachen Volumen Wasser am Rückflußkühler auf dem Wasserbade eingeeengt, bis reichliche Kristallisation erfolgte. Die Mutterlauge der ersten Kristallisation wurde unter vermindertem Druck und einer 40° nicht übersteigenden Temperatur völlig zur Trockene verdampft. Der Rückstand wurde zur Gewinnung des Prolins mit absolutem Alkohol ausgekocht, und der alkoholische Auszug mit dem bei der Fraktion III er-

haltenen vereinigt. Der in Alkohol unlösliche Teil wurde in Wasser heiß gelöst und in der üblichen Weise durch fraktionierte Kristallisation in die einzelnen Komponenten zerlegt. Die erste aus Wasser erhaltene Kristallisation bestand aus reinem Leucin. Isoliert wurden: 12,5 g Leucin, 5 g Alanin, 2,5 g Amino-valeriansäure und 0,75 g Glycocoll. Letzteres wurde aus einer der gesamten Fraktion aliquoten Menge als Esterchlorhydrat isoliert. Das isolierte Leucin schmolz gegen 297° (korr.).

0,1641 g Substanz gaben 0,1423 g H_2O und 0,3299 g CO_2

Berechnet für $C_6H_{12}NO_2$:

Gefunden:

54,96 % C und 9,92 % H. 54,83 % C und 9,77 % H.

Das bei 293° (korr.) schmelzende Alanin gab folgende Zahlen:

0,1839 g Substanz gaben 0,2728 g CO_2 und 0,1273 g H_2O

Berechnet für $C_3H_7NO_2$:

Gefunden:

40,45 % C und 7,87 % H. 40,45 % C und 7,69 % H.

Aminoisovaleriansäure:

0,1120 g Substanz gaben 0,2102 g CO_2 und 0,0961 g H_2O

Berechnet für $C_6H_{11}NO_3$:

Gefunden:

51,28 % C und 9,40 % H. 51,10 % C und 9,53 % H.

Glycocollesterchlorhydrat:

0,1835 g Substanz gaben 0,2298 g CO_2 und 0,1230 g H_2O

Berechnet für $C_6H_{10}NO_2Cl$:

Gefunden:

34,43 % C und 7,18 % H. 34,16 % C und 7,48 % H.

Fraktion III.

Sie wurde nach Verseifung mit Wasser unter vermindertem Druck völlig zur Trockene verdampft, und der Rückstand mit absolutem Alkohol ausgekocht. Der so erhaltene alkoholische Auszug wurde mit dem entsprechenden Extrakte aus Fraktion II vereinigt und unter vermindertem Druck die ganze Flüssigkeit zur Trockene verdampft, der Rückstand nochmals in absolutem Alkohol gelöst, vom ungelöst Gebliebenen abfiltriert, und das Filtrat nochmals eingedampft. Der verbleibende Rückstand wurde nunmehr in Wasser gelöst, die wässrige Lösung mit überschüssigem Kupferoxyd gekocht, vom ungelöst gebliebenen Kupferoxyd abfiltriert, und das Filtrat zur Kristallisation eingeengt. Das so erhaltene Prolinkupfer entsprach einer

Menge von 10,5 g α -Pyrrolidincarbonensäure. Die Trennung in die aktive und racemische Form erfolgte, wie üblich, durch Auskochen mit absolutem Alkohol.

1,2210 g racemisches Prolinkupfer verloren bei 120° 0,1360 g H_2O
 = 11,13% H_2O .

Berechnet für $C_{10}H_{16}O_4N_2Cu + 2 H_2O$: 10,99% H_2O .

0,1250 g bei 120° getrocknetes Prolinkupfer ergaben 0,0341 g CuO
 = 0,0272 Cu = 21,7% Cu.

Berechnet für $C_{10}H_{16}O_4N_2Cu$: 21,8% Cu.

Aus dem in absolutem Alkohol unlöslichen Teil wurden durch fraktionierte Kristallisation 14,5 g Leucin, 3 g Alanin, 2 g Aminoisovaleriansäure erhalten.

IV. Fraktion.

Diese Fraktion, die die Ester der Glutaminsäure, der Asparaginsäure und des Phenylalanins und höchst wahrscheinlich des Serins enthielt, wurde, wie bereits wiederholt geschildert, zunächst vom Phenylalaninester befreit, und die übrigen Ester mit Baryt verseift. Vom Phenylalanin wurden 12,5 g erhalten.

0,1509 g Substanz gaben 0,3612 g CO_2 und 0,0895 g H_2O .

Berechnet für $C_9H_{11}NO_3$:

Gefunden :

65,45% C und 6,66% H.

65,28% C und 6,59% H.

Aus der mit Baryt verseiften Lösung fiel beim längeren Stehen asparaginsaurer Baryt in Kristalldrüsen aus. Durch Umsetzen mit Schwefelsäure wurden 2 g reine Asparaginsäure gewonnen :

0,1800 g Substanz gaben 0,2380 g CO_2 und 0,0877 g H_2O .

Berechnet für $C_4H_7O_4N$:

Gefunden :

36,09% C und 5,26% H.

36,06% C und 5,41% H.

Das Filtrat vom asparaginsauren Baryt wurde mit Schwefelsäure quantitativ vom Baryt befreit, stark eingedampft, mit Salzsäuregas gesättigt und in der Kälte mehrere Tage aufbewahrt. Die ganze Masse hatte sich in einen dicken Kristallbrei verwandelt. Auf freie Glutaminsäure berechnet, betrug die Ausbeute 22,0 g.

0,1855 g Substanz gaben 0,2752 g CO_2 und 0,1009 g H_2O .

Berechnet für $C_5H_9NO_4$:

Gefunden :

40,81% C und 6,12% H.

40,47% C und 6,08% H.

Aus der Mutterlauge des Glutaminsäurechlorhydrates wurde durch Kochen mit Bleioxyd die Salzsäure entfernt und aus der filtrierten, vom gelösten Blei befreiten Lösung durch Einengen noch 10 g Asparaginsäure gewonnen. Aus dem Filtrat der Asparaginsäure wurde durch weiteres Einengen eine süß schmeckende Verbindung isoliert, welche beim Erhitzen im Kapillarrohr sich von 215° an bräunte und bei 240° (korr.) völlig geschmolzen war. Offenbar lag Serin vor. Leider gab die Analyse keine gut stimmenden Werte.

Destillationsrückstand.

Der Destillationsrückstand wurde, wie bereits wiederholt beschrieben, mehrere Stunden mit Baryt am Rückflußkühler gekocht, dann der Baryt quantitativ mit Schwefelsäure entfernt, und das Filtrat vom Baryumsulfat stark eingengt. Hierbei schied sich eine schwer lösliche, dem Leucin ähnliche Verbindung ab, welche auch das charakteristische blaßblaue Kupfersalz des Leucins gab. Durch Einleiten von gasförmiger Salzsäure in die konzentrierte Lösung und nach längerem Stehen auf Eis wurde eine reichliche Kristallisation von Glutaminsäurechlorhydrat erhalten. Auf Glutaminsäure umgerechnet betrug die Ausbeute 4,2 g. Das Filtrat des Glutaminsäurechlorhydrates wurde durch Kochen mit Bleioxyd von der Salzsäure befreit. Es enthält die Mutterlauge der Glutaminsäure neben geringen Mengen von Asparaginsäure, Produkte, welche weder selbst kristallisieren, noch gut kristallisierbare Derivate z. B. Kupfersalze geben. Diese Produkte sind regelmäßig bei fast allen ausgeführten Hydrolysen von Eiweißkörpern beobachtet worden, ohne daß es uns bis jetzt gelungen wäre, diese höchst wahrscheinlich sekundär entstandenen Produkte so charakterisieren zu können, daß eine genaue Definition derselben möglich gewesen wäre, obwohl wiederholt Analysenresultate erhalten worden sind, welche wohl Berechnungen zuließen. Da jedoch jede Gewähr für eine Einheitlichkeit dieser Produkte und jeder Einblick in ihre Entstehungsart fehlt, haben wir es unterlassen, Schlüsse aus unseren Analysen zu ziehen.

Berechnet man die gefundenen Mengen an Aminosäuren auf 100 g reines Conglutin, so erhält man folgende Werte:

| | |
|--------------------|--------|
| Glycocoll | 0,8 ‰ |
| Alanin | 2,5 ‰ |
| Aminovaleriansäure | 1,1 ‰ |
| Leucin | 6,75 ‰ |
| Prolin | 2,6 ‰ |
| Phenylalanin | 3,1 ‰ |
| Glutaminsäure | 6,5 ‰ |
| Asparaginsäure | 3,0 ‰ |

Nachschrift: Nach Abschluß dieser Untersuchung ist eine denselben Eiweißkörper betreffende Arbeit von E. Winterstein und E. Pantanelli¹⁾ erschienen, deren Resultate mit den unsrigen übereinstimmen. Eine Ausnahme macht nur das Glycocoll, das die genannten Autoren vermißten.

¹⁾ E. Winterstein und E. Pantanelli, Über die bei der Hydrolyse der Eiweißsubstanz der Lupinensamen entstehenden Monoamino-säuren. Diese Zeitschrift, Bd. XLV, S. 61, 1905.

Untersuchungen über das Skatol.

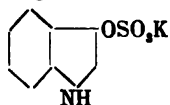
Von
Ch. Porcher und Ch. Hervieux.

Mit einer Tafel.

(Aus dem chemischen Laboratorium der École nationale vétérinaire zu Lyon.)
(Der Redaktion zugegangen am 20. Juli 1905.)

Während man die verschiedenen Umwandlungen, die das Indol nach der Resorption vom Darm aus durchmacht, hinreichend kennt, sind unsere Kenntnisse bezüglich des Skatols viel lückenhafter, sodaß es wünschenswert erscheint, einmal zu prüfen, was für objektive Veränderungen der Harn aufweist, wenn man ihn nach größeren Skatolgaben mit den üblichen Reagentien untersucht.

Vom Indol ist es ja bekannt, daß es, auf diese oder jene Weise in den Tierkörper eingeführt, im Urin als Indikan,¹⁾ das Kaliumsalz der Indoxylschwefelsäure, ausgeschieden wird, deren Formel bekanntlich die folgende ist



Nun liegt es außerordentlich nahe, von dem mit dem Indol verwandten Skatol anzunehmen, daß es nach der Resorption einfach seine Methylgruppe verliere und gleichfalls in der Form von Indikan ausgeschieden werde; das nehmen denn auch eine Reihe von Forschern an; allein unsere Versuche erwiesen das

¹⁾ Ist übrigens die verabfolgte Menge an Indol zu groß, so wird ein erheblicher Teil davon nicht als Indikan ausgeschieden, sondern in einer andern Form, über die man noch nicht ganz im klaren ist; es handelt sich auch hierbei um ein Derivat des Indoxyls, doch nicht um ein Produkt der Paarung mit Schwefelsäure.

Gegenteil, denn der Farbstoff, den wir nach Einführung von Skatol erhielten, ist ein ganz anderer, als der vom Indikan sich herleitende. Läßt man nämlich auf Indican starke Salzsäure unter Zusatz eines schwachen Oxydationsmittels einwirken, so erhält man zwei Indigofarbstoffe, einen blauen und einen roten. Der blaue, stärker in den Vordergrund tretende, ist in Chloroform löslich, der rote, auch Indirubin genannt, löst sich in Chloroform und Äther. Dagegen liefert bei der gleichen Behandlung Skatolharn ausschließlich einen roten Farbstoff, der sich aber vom Indirubin dadurch unterscheidet, daß er sich in Chloroform und Äther nicht löst.

Auf die Einzelheiten dieser Reaktionen werden wir später noch eingehen. Vorerst möchten wir einiges in betreff der Versuchsanordnung erwähnen.

In erster Linie war es für uns von Wichtigkeit, einen Harn zu bekommen, der womöglich kein Indikan enthielt, und wir erreichten dies am einfachsten, indem wir die Tiere zuerst gründlich abführen ließen und sie weiterhin, während der ganzen Versuchszeit nur mit Milch, der man passend etwas Molke zusetzen kann, ernährten. Brotsuppe leistete dieselben Dienste. Auf diese Weise erhält man einen Urin, der so gut wie gar keine Indoxylderivate mehr enthält. Prüft man ihn unter Anwendung des bewährten Verfahrens von Bouma¹⁾ mit chlorhydrischem Isatin, so geht in den Chloroformauszug nur ein äußerst schwacher rosa Farbstoff über, den man vernachlässigen kann.

Wir möchten noch bemerken, daß wir es für unerlässlich halten, die Versuchstiere in der angegebenen Weise zu behandeln.

Was nun die Art betrifft, in der das Skatol verabreicht wurde, so bedienten wir uns anfangs wegen seiner geringen Löslichkeit in Wasser einer stark alkoholischen Lösung, die entweder unter die Haut gespritzt oder per os verabreicht wurde. Da man auf diese Weise aber meist durch den Alkohol schwere Vergiftungen erzeugt, die häufig zum Tode führen, ist es zweckmäßiger, das Skatol fein zu pulverisieren, mit Öl gründlich bis zur Bildung einer gleichmäßigen Suspension zu verreiben und so mit Hilfe der Schlundsonde in den Magen ein-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXII, S. 82, 1902.

zuführen. Dieser Methode, die ja auch die natürlichen Verhältnisse am besten nachahmt, bedienten wir uns später ausschließlich, doch sei bemerkt, daß in jedem Falle der Urin sehr schnell die Eigenschaft bekam, nach Zusatz des gleichen Volumens Salzsäure eine rote Farbe zu zeigen.

Wir gehen jetzt zur Schilderung der einzelnen Versuche über.

Versuche.

Zuerst hatten wir zu erweisen, daß Urin, der sofort nach der Verabreichung des Skatols gelassen wird, niemals freies Skatol enthält, er hat die normale Farbe und den gewöhnlichen Geruch.

Man stellt den Harn zu diesem Zwecke im Dampfstrom, extrahiert das Destillat mit Benzol und prüft das Extrakt nach Ehrlich¹⁾ mit p-Diaminobenzaldehyd. Diese für Skatol so empfindliche Reaktion fällt dann negativ aus.

100 ccm Harn werden mit etwas Natronlauge alkalisch gemacht und hierauf mit 25 ccm Äther oder besser noch (völlig thiophenfreiem) Benzol ausgeschüttelt. Der Auszug gibt nicht einmal nach dem teilweisen Eindampfen die Ehrlichsche Reaktion.

Nun kam es darauf an, zu ermitteln, auf welche Weise man am besten das Vorhandensein der Muttersubstanz des Skatolfarbstoffes im Urin nachweisen könnte; bisher bediente man sich ja meistens der Salzsäure, die in positiven Fällen eine schöne Rosa- bis Rotfärbung erzeugt. Doch schien es uns nicht unwichtig, auch mit andern Säuren einen Versuch zu machen. So erhielten wir mit Essigsäure, sowie mit 10%iger Schwefelsäure in der Kälte keine Färbung, wohl aber, wenn wir mit 10%iger Schwefelsäure erwärmten; da jedoch in diesem Falle die Reaktion nicht so intensiv ist, andererseits es unzulässig erscheint, noch mehr Schwefelsäure anzuwenden, sind wir dahin

¹⁾ Dies geschieht am besten auf folgende Weise: Man verdünnt den Benzolextrakt mit dem fünften Volumen einer alkoholischen Lösung von p-Dimethylaminobenzaldehyd (1:20) und schichtet mit Hilfe einer feinen Pipette etwas konzentrierte Salzsäure darunter; ist Skatol vorhanden, so tritt an der Berührungsfläche beider Flüssigkeiten eine blauviolette Färbung auf.

gekommen, bei unseren weiteren Beobachtungen uns ausschließlich der Salzsäure zu bedienen; man fügt einfach das gleiche Volumen der reinen Säure hinzu und erhält je nach der Konzentration des in Frage stehenden Körpers sofort eine deutliche Rosa- bis Rotfärbung. Auf das sofortige Auftreten der Farbenreaktion möchten wir besonders hinweisen. Es ist dies ein charakteristisches Unterscheidungsmerkmal gegenüber dem Indirubin. Bei der Erzeugung der Indigoreaktion in Indikanharnen durch Salzsäure tritt nämlich der rote Farbstoff erst allmählich nebem dem Indigoblau auf, sodaß er eher als etwas Sekundäres anzusehen ist.

Um zu prüfen, ob man auch mit weniger Salzsäure dasselbe erreichen könne, reinigten wir den Urin mit Bleizucker, fällten das überschüssige Blei mit Natriumsulfat aus und versetzten nun

1. 10 ccm des Filtrates mit 1 ccm Salzsäure.
2. 10 „ „ „ „ 2 „ „
3. 10 „ „ „ „ 5 „ „
4. 10 „ „ „ „ 10 „ „

Es zeigte sich sofort, daß in der Kälte der Farbenton bei 1 und 2 viel schwächer, als bei 3 und vor allem bei 4 war; setzten wir aber die beiden ersten Proben auf ein siedendes Wasserbad, so trat auch hier die Farbe so deutlich hervor, wie im Falle der stärksten Konzentration. Die Erwärmung des Harnes an sich konnte auf die Harnfarbe selbst keinen Einfluß haben, da es sich in unserem Falle nicht um Pflanzenfresser handelte. Der Harn solcher Tiere hingegen gibt ja oft infolge seines Gehaltes an aromatischen Substanzen schon bei einfachem Erwärmen eine Farbenveränderung, indem er dunkelbraun wird.

Auch der Zusatz geringer Mengen von Oxydationsmitteln, wie H_2O_2 oder Alkalipersulfat, ist auf die Stärke der Farbe nicht ohne Einfluß. Gibt man nämlich zu den Proben 1 und 2 in der Kälte zwei Tropfen Wasserstoffsuperoxyd, so wird das Rot stärker, doch ist ein Zuviel an oxydierendem Mittel entschieden von Nachteil, indem dann die Farbe wieder abbläßt; nicht uninteressant ist es dabei, daß dasselbe Quantum H_2O_2 ,

das die matten Proben intensiver macht, die Proben 3 und 4 wieder etwas entfärbt, sodaß sie nach Zusatz von 4 Tropfen Wasserstoffsuperoxyd bereits ganz farblos sind.

Wir müssen noch bemerken, daß ein solcher Einfluß von Oxydationsmitteln sich unseres Erachtens nur bei Urinen geltend macht, die die betreffende Muttersubstanz in relativ geringer Menge enthalten; hätten wir Urine zur Verfügung gehabt, die von Fütterungsversuchen mit 0,5 oder gar 1 g Skatol stammten, so würde sich gewiß die Wirkung der Oxydation kaum haben äußern können.

Interessant schien uns übrigens auch noch ein Versuch mit Salpetersäure, da diese zugleich eine starke Mineralsäure und ein gutes Oxydationsmittel ist. In der Tat erreichten wir unter Anwendung 10%iger Säure eine schöne Rotfärbung, die sich 2 bis 4 Wochen bei Zimmertemperatur hielt, beim Erwärmen auf dem Wasserbade aber verloren ging.

Nach alledem sind wir denn zu dem Schluß gekommen, bei Anstellung der Probe der Salzsäure in der Regel kein Oxydationsmittel hinzuzufügen. Nur in Fällen, wo die Menge der in Frage stehenden Substanz erheblich ist, setzen wir eine Spur Wasserstoffsuperoxyd zu.

Sehr bemerkenswert ist es fernerhin, daß nach längerem Stehen in der roten, sauren Flüssigkeit eine Trübung auftritt, die zur Ausscheidung zerfließlicher, allmählich zu Boden sinkender Flocken von dunkelroter Farbe führt. Man kann dieses Sediment auch schneller gewinnen, wenn man zentrifugiert. Die darüberstehende Flüssigkeit ist dann nur noch gelbrot. — Auf diese Weise hat man also die Möglichkeit, das «Skatolrot», wie wir den roten Farbstoff kurz nennen wollen, in reinerer Form darzustellen.

Was nun das Verhalten gegen verschiedene Lösungsmittel betrifft, so konstatierten wir, daß das Skatolrot in Äther, Petroläther, Benzol, Schwefelkohlenstoff und Chloroform unlöslich ist. Das Chloroform nimmt allerdings nach anhaltendem Schütteln mit einem Urin, der den in Rede stehenden Körper besonders reichlich enthält, einen sehr schwach rosa Ton an, doch glauben wir, daß das Skatolrot in diesem Falle nicht selbst im Chloro-

form gelöst ist, sondern nur die salzsaure Flüssigkeit, die den Farbstoff enthält. — Die Unlöslichkeit in Chloroform und Äther ist ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal gegenüber dem Indigotin und Indirubin, denn wie schon erwähnt, löst sich ja das erstere in Chloroform, das letztere in beiden Lösungsmitteln, sodaß man auf diese Weise in den Stand gesetzt ist, die drei Körper von einander zu trennen.

Als Lösungsmittel für das Skatolrot bewährte sich uns am besten der Amylalkohol, der nach gelindem Schütteln schnell den Farbstoff aufnimmt; verwendet man Amylacetat, so muß intensiver geschüttelt werden.

Eine weitere wichtige Beobachtung, die wir machten, ist die, daß der Farbstoff anscheinend nur in sauren Lösungen beständig ist. Macht man nämlich eine deutlich rot gefärbte Harnprobe mit Natronlauge alkalisch, so blaßt sie gänzlich ab und die Farbe kehrt erst nach erneutem Ansäuern mit Salzsäure wieder. Danach kann man sich die Anschauung bilden, daß das Skatol auf seinem Wege durch den Organismus in einen Körper übergeht, der als farbloses Salz im Harn auftritt, und daß aus diesem Salz bei Behandlung mit starken Mineralsäuren eine farbige Säure, eben das Skatolrot, frei wird.

Ließ man übrigens die Natronlauge auf die oben erwähnten Flocken einwirken, so lösten sie sich unter Entfärbung vollständig auf, während ein stark gefärbter amylalkoholischer Extrakt nicht zum völligen Abblässen zu bringen war. Amylalkohol hält den Farbstoff merkwürdig fest.¹⁾

Interessant ist ferner das Verhalten der Substanz gegen Reduktionsmittel. Läßt man nämlich Zinkstaub mit Essigsäure oder Salzsäure auf sie einwirken, so tritt gleichfalls eine Entfärbung ein, die durch vorsichtigen Zusatz von Alkalipersulfat-

¹⁾ Diese Eigentümlichkeit kommt nicht dem Skatolrot allein zu; auch beim Billiverdin beobachtete der eine von uns, daß eine amylalkoholische Lösung, mit verdünnter Natronlauge neutralisiert oder gar alkalisch gemacht, selbst bei anhaltendem, energischem Schütteln nur sehr schwer seine Farbe an Wasser abgibt. Es ist das ohne Zweifel ein Nachteil dieses sonst so ausgezeichneten, viel angewandten Lösungsmittels.

lösung rückgängig gemacht wird. War von diesem Oxydationsmittel etwas reichlich zugesetzt worden, so ließ sich jedoch die Entfärbung durch Reduktion nicht wieder erzielen.

Auch nach Fällungsmitteln für das Skatolrot haben wir gesucht und Quecksilbernitrat sowie Bleiessig sehr wirksam in dieser Richtung gefunden. Bleiessig fällt den Farbstoff weniger vollständig, wie das Quecksilbersalz, das ihn fast ganz zur Ausscheidung bringt, wenn es sich nicht gerade um eine allzu intensiv gefärbte Lösung handelt. Nicht mitgerissen wird der Körper jedoch durch Bleizucker,¹⁾ wiewohl es zweckmäßig ist, den Harn vorher mit diesem Fällungsmittel zu behandeln; man bekommt auf diese Weise ein Filtrat, das viel weniger tingiert ist, als der ursprüngliche Harn, und nach dem Zusatz von Salzsäure tritt die Rotfärbung dann um so klarer hervor.

Was nun vor allem als ein bemerkenswerter Punkt in unseren Untersuchungen hervorgehoben werden muß, ist die Tatsache, daß es uns nie gelungen ist, neben dem Skatolrot, Indikan nachzuweisen; es ist dies deshalb von Wichtigkeit, weil damit die Behauptung, das Skatol verliere auf dem Wege durch den Tierkörper seine Methylgruppe und werde als Indoxylverbindung ausgeschieden, für immer widerlegt ist. Man mag das Skatol auf diese oder jene Weise dem Organismus zuführen, stets tritt im Harn ein Chromogen auf, das mit dem Indikan nichts zu tun hat.

Nachdem wir so das Verhalten des Skatolrotes zu verschiedenen Substanzen studiert hatten, erübrigte es noch, den Farbstoff spektroskopisch eingehend zu untersuchen. Hierbei machte sich nun der Mangel einer quantitativen Bestimmungsmethode recht geltend; um aber doch wenigstens einen gewissen Anhalt für die Konzentration der jeweils zu untersuchenden Lösung zu haben, stellten wir uns zuerst eine möglichst konzentrierte und hinreichend reine Skatolrotlösung auf folgende Weise her: Der Harn eines Tieres, dem Skatol in größerer Dosis eingegeben war, wurde mit Bleizucker gefällt, nach dem Filtrieren

¹⁾ In Ermangelung einer exakten Bestimmungsmethode des Skatolrotes haben wir uns begnügen müssen, mit Hilfe des kolorimetrischen Verfahrens die Quantitäten annähernd zu schätzen.

mit dem gleichen Volumen reiner Salzsäure versetzt und bis zur Abscheidung von Flocken stehen gelassen; nachdem diese dann durch Zentrifugieren isoliert waren, wurden sie in wenig Amylalkohol gelöst, worauf die amyalkoholische Lösung mehrmals mit Wasser durchgeschüttelt und filtriert wurde; auf diese Weise bekamen wir eine schöne klare Lösung, von der wir je nach Bedarf tropfenweise etwas in das Gefäß des spektroskopischen Apparates hineingaben; dieses wurde dann mit Amylalkohol versetzt und gut umgeschüttelt.

Beginnt man nun bei der Beobachtung mit sehr verdünnten Lösungen, so sieht man zuerst nur ein graues Band auftreten, dessen Ränder verwaschen sind, das sich aber mehr und mehr hervorhebt, wenn man die Konzentration, resp. die Dicke der Flüssigkeitsschicht steigert; man erkennt dann deutlich seine Lage zwischen den Wellenlängen 577 und 550 links von der D-Linie des Natriums. (Siehe Tafel I.)

Anders gestaltet sich das Bild, wenn man statt des gereinigten Präparates einfach das amyalkoholische Extrakt eines chromogenhaltigen Harnes untersucht, der vorher mit Salzsäure angesäuert war; in diesem Falle tritt links von dem soeben definierten Band jenseits der D-Linie noch ein zweiter schmalerer Streifen von wechselnder Helligkeit¹⁾ auf; manchmal nur als leichte Färbung angedeutet, liegt er etwa in der Gegend der Wellenlänge 624. (Siehe Tafel II.)

Bei den Konzentrationen, die wir wählten, zeigte sich außerdem eine Verdunkelung des ganzen Spektrums auf der rechten Seite, die sich über das Gebiet des Violett, des Blau, ja bis ins Grün hinein erstreckte, sodaß von diesen Farben dann nichts mehr zu sehen war. Besonders haben wir das gefunden bei Untersuchung von Urinen, die reich an dem von Nencki und Sieber entdeckten Urorosein waren; dieses liefert gleichfalls den charakteristischen ersten Streifen des Skatolrots, weswegen wir nicht anstehen, beide Körper miteinander zu identifizieren. Der zweite Streifen muß offenbar auf Verun-

¹⁾ Die verschiedene Intensität dieses zweiten Absorptionsstreifens deutet natürlich darauf hin, daß der ihm zugrunde liegende chemische Körper in sehr wechselnden Mengen im Urin auftritt.

reinigungen zurückgeführt werden. Bemerkt sei übrigens noch, daß bei sehr starker Konzentration alle Teile des Spektrums zur Absorption kommen, mit Ausnahme des Gebietes vom Ultrarot bis zur Wellenlänge 624.

Soweit unsere Versuche. Im folgenden werden wir nun etwas näher auf die einschlägige Literatur eingehen und gleichzeitig den von uns eingenommenen Standpunkt näher präzisieren.

Eine mit dem Skatolrot identische Substanz ist zweifellos schon früher bekannt gewesen, doch ist es uns vermöge verbesserter Versuchsanordnung gelungen, zu einer reineren Darstellung zu gelangen und zu gleicher Zeit die Beziehung des Körpers zum Skatol einwandfrei zu erweisen. — Überblickt man die nicht geringe Zahl von Arbeiten, die sich mit dem Auftreten von roten Farbstoffen im Urin beschäftigen, so findet man erstens einmal eine Reihe von Substanzen geschildert, die von den betreffenden Autoren mit dem Skatol nicht in Zusammenhang gebracht werden. Es ist dies besonders das Urorosein von Nencki und Sieber,¹⁾ das Uroerythrin von Simon,²⁾ des weiteren ein von Giacosa³⁾ gefundener Farbstoff, dann das Purpurin von Golding Bird, das Uromelanin von Plosz⁴⁾ und eine Substanz, deren Auftreten im Harn Melanotischer von Brandl und Pfeiffer⁵⁾ beschrieben wurde. Davon interessiert uns vor allem das von Nencki und Sieber entdeckte Urorosein, da es in der Tat mit dem von uns dargestellten Körper als identisch bezeichnet werden muß, denn im wesentlichen auf gleiche Weise dargestellt zeigen beide Substanzen dasselbe chemische Verhalten und ein gleiches Spektrum. Weniger sicher ist uns eine solche Identität mit den Farbstoffen, die von Simon, Giacosa und Brandl und Pfeiffer beschrieben sind, doch haben wir den Eindruck gewonnen, daß es sich auch hier im wesentlichen um Skatolrot gehandelt hat, nur wird eine mangelhafte Reindarstellung zu ungenauen Resultaten geführt haben.

¹⁾ Journal f. prakt. Chemie [2], Bd. XXVI, S. 333 (1882).

²⁾ Handbuch der angewandten mediz. Chemie, Bd. VII, S. 342 (1840).

³⁾ Ann. di chim. e di farmac. [4], Bd. III, S. 201.

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. VIII, S. 89 (1883).

⁵⁾ Zeitschrift für Biologie, Bd. XXVI, S. 375.

Eine Reihe anderer Forscher beschränken sich auf die Schilderung von Farbstoffen, die sie erhielten, wenn Tieren künstlich Skatol zugeführt wurde, wie wir selbst das ja auch getan haben. Es kommen hier vor allem in Betracht die Arbeiten von Brieger,¹⁾ Mester,²⁾ Otto,³⁾ Rössler⁴⁾ und neuerdings noch die Publikation von Grosser.⁵⁾

Auch diese Autoren haben zweifellos «Skatolrot» in Händen gehabt, doch begingen sie alle den Fehler, nicht die Indoxylderivate vorher zu beseitigen, sodaß man nie weiß, inwieweit der in Frage stehende Skatolfarbstoff verunreinigt war; nicht oft genug können wir deshalb darauf hinweisen, wie wichtig es ist, sich bei Fütterungsversuchen mit Skatol der im Anfange dieser Arbeit geschilderten Kautelen zu bedienen: es ist ganz unerlässlich, den Darm vorher gründlich zu entleeren und auch weiterhin während der ganzen Versuchszeit die Bildung von Fäulnisprodukten nach Möglichkeit zu verhüten. Der Unterlassung dieser Vorsichtsmaßregel ist es auch zweifellos zuzuschreiben, daß Brieger nach der Verfütterung von Skatol an Kaninchen einen Farbstoff aus dem Urin gewann, der, wenn auch sonst mit unserem Skatolrot ziemlich übereinstimmend, sich doch durch eine gewisse Löslichkeit in Chloroform und Äther von diesem unterschied, ein deutlicher Hinweis auf eine Verunreinigung mit Indirubin. Das gleiche muß von dem Farbstoff gelten, den Mester nach Verfütterung von Skatol aus dem Urin eines Hundes darstellte; auch hier wird Chloroform als Lösungsmittel verwandt.

Nur streifen wollen wir weiterhin die Arbeit von Otto, der, ohne in betreff des Skatolrotes wesentlich neues beizubringen, sich in erster Linie mit der Muttersubstanz unseres Farbstoffes befaßt hat; über dieses «Chromogen» werden wir selbst in einer späteren Publikation ausführlicher berichten.

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Gesellschaft, Bd. XII, S. 1988 (1879).
Diese Zeitschrift, Bd. IV, S. 416 (1880).

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XII, S. 130 (1888).

³⁾ Archiv für die Ges. Physiologie, Bd. XXXIII, S. 615 (1884).

⁴⁾ Zentralblatt für innere Medizin, Nr. 35, S. 847 (1901).

⁵⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 320 (1905).

Hier möchten wir aber noch etwas näher auf die Resultate, die Rössler bekommen hat, eingehen; er experimentierte am Menschen und gewann nach Verabreichung von Skatol per os aus dem Harn einen Farbstoff, der mit dem unsern im wesentlichen übereinstimmt, von Rössler aber als durchaus verschieden von Urorosein hingestellt wird; ohne die Einzelheiten dieser Untersuchung alle durchgehen zu wollen, möchten wir doch auf zwei Punkte hinweisen, die uns besonders zur Kritik Anlaß geben: Rössler benutzt, um die Verwandtschaft seiner Substanz mit dem Skatol zu erweisen die Nitroprussidreaktion; diese fällt aber mit ganz reinem Skatol negativ aus. Des weiteren bekommt er bei der Destillation mit Zinkstaub Rotfärbung eines in Salzsäure getauchten Fichtenspanes, was ja für Pyrrol charakteristisch ist; das gleiche kann man jedoch auch beim Indol erzielen, sodaß von einer scharfen Charakterisierung des in Frage stehenden Körpers auf diese Weise nicht die Rede sein kann.

Die neuste für unser Thema in Betracht kommende Arbeit stammt von Grosser; er stimmt eigentlich in allen Punkten mit der Ansicht überein, die wir selbst schon in einer vorläufigen Mitteilung¹⁾ dargelegt hatten. Vor allem identifiziert auch er das Skatolrot mit dem Urorosein.

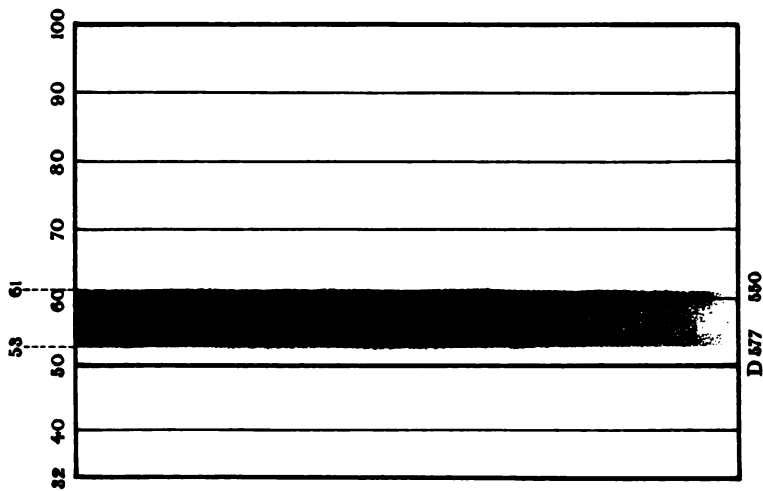
Nicht unerwähnt dürfen zum Schluß die Publikationen von Rosin²⁾ und Maillard³⁾ bleiben. Rosin, der schon im Jahre 1891 eine Zusammenstellung aller einigermaßen gut charakterisierten roten Harnfarbstoffe gab und jeden einer eingehenden Kritik unterzog, macht bereits damals darauf aufmerksam, daß der von Brieger beschriebene Körper wahrscheinlich stark mit Indigofarben verunreinigt gewesen ist, ferner zieht er eine scharfe Grenze zwischen dem Skatolfarbstoff und dem Indirubin; das gleiche tut auch Maillard, der in einer ausgezeichneten Arbeit die Resultate Rosins noch näher präzisiert.

¹⁾ Comptes rendus à l'Académie des Sciences, 27. Juni 1904.

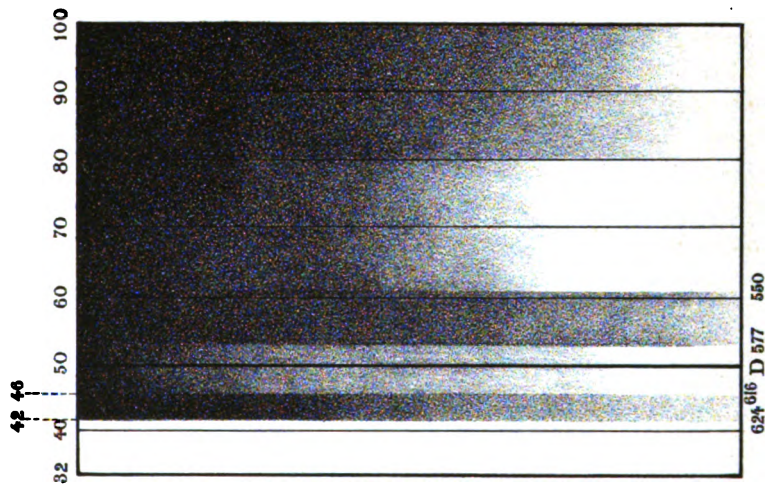
²⁾ Virchows Archiv, 123, S. 519 (1891).

³⁾ L'indoxyle urinaire et les couleurs qui en dérivent. Paris 1903, Schleicher frères.

I.



II.



Zu Porcher-Hervieux, Untersuchungen über das Statol.
 von Seydler's Zeitschrift für physiologische Chemie. Band XLV, Tafel 14.)

Karl v. Trübner in Strassburg.

Nach dieser kurzen Übersicht über die einschlägigen Arbeiten, möchten wir noch einmal hervorheben, daß für uns alle die roten Farbstoffe, die von Nencki und Sieber, Plosz, Golding Bird, Harley und Giacosa beschrieben sind, sich vom Skatol herleiten, in gleicher Weise, wie alle Indigofarben, die man aus Harn gewinnen kann, ausschließlich auf im Darm vorhandenes Indol zurückzuführen sind.

Zum Schluß sei noch besonders darauf hingewiesen, daß es uns gelungen ist, das regelmäßige Auftreten des Skatolrotes im Harn aller Tiere, die wir daraufhin untersuchten, zu erweisen. Vom Indikan war ein regelmäßiges Auftreten ja schon lange bekannt und wenn man den Skatolfarbstoff daneben oft übersehen hat, so liegt das offenbar an den häufig recht spärlichen Mengen, in denen er sich findet. Im Harn von Wiederkäuern ist sein reichliches Vorkommen bereits in verschiedenen Arbeiten beschrieben, die hier aufzuzählen wir nicht für nötig halten.

Diagnostische Schlüsse bezüglich eines krankhaften Zustandes an das gelegentliche Auftreten größerer Mengen Skatolrot im Harn zu knüpfen, erscheint uns bisher nicht möglich.

Bemerkung zu der Mitteilung der Herren Kutscher und Lohmann: «Die Endprodukte der Pankreasselbstverdauung».

Von

P. A. Levene.

(Der Redaktion zugegangen am 19. Juni 1906.)

In ihrer IV. Mitteilung über «Die Endprodukte der Pankreasselbstverdauung» machen Kutscher und Lohmann die folgende Bemerkung: «Eingehender haben wir uns noch mit der Frage beschäftigt, ob bei der Pankreasselbstverdauung sich regelmäßig Uracil oder Thymin bildet. Zahlreiche Versuche, die von Kutscher bereits früher in dieser Richtung angestellt waren, hatten ein negatives Resultat ergeben . . . Die Methode, welche von Kutscher zur Gewinnung des Thymins und Uracils aus den Verdauungsprodukten der Thymus benutzt wurde, hatte Levene in ganz ähnlicher Form auf das Pankreas angewandt. Er gibt an, damit dort Uracil gewonnen zu haben, das er durch Analyse als solches identifizierte.» Und zum Schluß: «Demnach treten Thymin und Uracil sicher nicht regelmäßig bei der Pankreasselbstverdauung auf.»

Da Kutscher einer der besten Kenner der Pyrimidinbasen ist, so mag seine Angabe einen gewissen Zweifel über die Richtigkeit meiner Beobachtungen über das Vorkommen von Uracil bei der Pankreasautolyse erregen. Nun ist aber meine Erfahrung von der des Herrn Kutscher verschieden. Ich hatte dreimal Gelegenheit, das Endprodukt der Pankreasautolyse auf Pyrimidinbasen zu untersuchen und habe dabei in keinem Falle das Uracil vermißt,¹⁾ und zwar zum erstenmal einige Zeit vor dem Erscheinen der Kutscherschen Mitteilung über «Das proteolytische Enzym der Thymus.»²⁾ Das Verfahren zur Trennung der Pyrimidinbasen von den anderen Endprodukten beruhte zwar in meiner Arbeit auf demselben Prinzip wie das von Kutscher, doch war es nicht mit diesem identisch.

Der Unterschied zwischen den beiden Verfahren ist der folgende:

1. Die Abscheidung der Alloxurbasen durch Silbernitrat wird von Kutscher bei schwach saurer Reaktion ausgeführt. In meiner Arbeit

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXII, S. 546, 1901; Bd. XXXVII, S. 527, 1903; Bd. XLI, S. 397, 1904.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXIV, S. 114, 1901.

wurde die die Alloxurbasen enthaltende Flüssigkeit so lange mit Salpetersäure behandelt, bis sie auf Congo sauer reagierte.

2. Die Histidinfraktion wird von Kutscher durch Schwefelwasserstoff vom Silber befreit und aus dem silberfreien Filtrate Histidin und Cytosin durch Phosphorwolframsäure entfernt.

Nur das Filtrat von diesem Niederschlage wurde auf die Anwesenheit von Pyrimidinbasen untersucht.

Das bei meiner Arbeit angewandte Verfahren war weniger kompliziert; das Filtrat vom Schwefelsilber wurde erhitzt bis der Schwefelwasserstoff entfernt war, dann mit Barytwasser genau von Schwefelsäure befreit und bei etwa 15 mm Druck bis zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in einem kleinen Überschuß von Schwefelsäure unter Erwärmen aufgelöst und der Kristallisation überlassen. Man braucht das so erhaltene Uracil nur einmal umzukristallisieren, um es analysenrein zu erhalten.

3. Die Quantität der angewandten Drüsen war bei meinen Versuchen bedeutend größer als in denen von Kutscher und Lohmann. Ich verwendete etwa 8 bis 10 kg für ein Experiment.

Hier möchte ich auch an einen Befund erinnern, den ich an anderer Stelle mitgeteilt habe.¹⁾ Genau gleiche Quantitäten von frischen Pankreasdrüsen und von solchen, die der Selbstverdauung unterworfen gewesen waren, wurden mit Salzsäure hydrolysiert. Aus den frischen Organen wurden gewonnen 0,460 g Uracil und 1,00 g Cytosin, aus den verdauten nur 0,600 g Uracil. Es scheint also, daß bei der Autolyse die Pyrimidinbasen einer Zersetzung unterworfen sind.

Die Abweichungen der von Kutscher und Lohmann erhaltenen Resultate von den meinigen können entweder durch die verschiedene Verdauungsintensität oder durch die Unterschiede im Verfahren zur Darstellung der Basen erklärt werden. Würde es den Herren Kutscher und Lohmann auch nach meinen Angaben nicht gelungen sein, Pyrimidinbasen darzustellen, so würde man zur Annahme der ersten Erklärung gezwungen sein.

¹⁾ American Journal of Physiology, Bd. XII, S. 283—285, 1904.

Notiz über den Nachweis von Fructose neben Glucosamin.

Von

Carl Neuberg.

(Der Redaktion zugegangen am 23. Juli 1905.)

Durch die Untersuchungen von L. Langstein¹⁾ weiß man, daß bei der Hydrolyse von Glykoproteiden Traubenzucker, Fructose und Glucosamin gleichzeitig auftreten können. Die beiden ersten lassen sich, wie früher gezeigt,²⁾ mittels Methylphenylhydrazin neben einander erkennen; das Verhalten des Glucosamins zu Methylphenylhydrazin unter verschiedenen Bedingungen ist jedoch unbekannt.

Wie früher angegeben (l. c.), bilden beide bei der gewöhnlichen Art der Osazondarstellung ebensowenig das Methylphenylosazon, als es hierbei der Traubenzucker tut, wie schon 1889 E. Fischer³⁾ fand. Für physiologische Zwecke haben Neuberg und Strauß⁴⁾ zwei verschiedene Vorschriften zum Nachweis des Fructzuckers angegeben: entweder wird das Gemisch der Komponenten 3—5 Minuten auf einem siedenden Wasserbade erhitzt und dann bei Zimmertemperatur belassen oder das Gemisch wird 24 Stunden im Brutschrank auf 40° erwärmt.

Nun hat Lobry de Bruyn⁵⁾ gezeigt, daß freies Glucosamin beim Stehen seiner alkoholischen Lösung eine Umlagerung zu Fructosamin erfährt; letzteres würde mit Methylphenylhydrazin wahrscheinlich wie freier Fructzucker reagieren.

Bei 24-stündigem Stehen in gelinder Wärme (40°), nicht aber bei 5-minütigem Erhitzen zum Sieden, erhält man aus Glucosaminacetat⁶⁾ eine kleine Menge Methylphenylosazon, wenn auch nicht im entferntesten die zu erwartende Quantität. Um aber ein für alle Fälle brauchbares Verfahren zu haben, empfiehlt es sich, auf längere Erwärmung im Brutschrank zu verzichten, sondern die Komponenten nur 3—5 Minuten auf siedendem Wasserbade zu erhitzen, abkühlen zu lassen und nach der früheren Angabe zu verarbeiten. Dabei liefert allein der Fructzucker ein Methylphenylosazon.

Mittels Methylphenylhydrazin kann man also Fructose neben Glucosamin erkennen; letzteres kann ohne weiteres durch Phenylisocyanat nach Steudel oder durch Oxydation zu Isozuckersäure nachgewiesen werden.

¹⁾ L. Langstein, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol., Bd. VI (1905).

²⁾ C. Neuberg, Ber., Bd. XXXV, S. 960 (1902).

³⁾ E. Fischer, Ber., Bd. XXII, S. 91 (1889).

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVI, S. 233 (1902).

⁵⁾ Sitzungsber. d. Akad. d. Wissensch. Amsterdam, Januar 1892.

⁶⁾ Offenbar setzten sich HCl-Glucosamin und essigsaures Methylphenylhydrazin zu Glucosaminacetat und dem Chlorhydrat des Hydrazins um. Das Acetat erleidet dann wohl langsam und partiell die Umwandlung im Sinne Lobry de Bruyns.

